

SÉRIE A, N° 849

N° D'ORDRE :

1614

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE THOMAS

PRÉPARATEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES
ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LES PROTÉIQUES DE LA LEVURE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *20* Juin 1919 devant la Commission d'examen

MM. LIPPMANN.	<i>Président</i>
URBAIN.	} <i>Examineurs</i>
FERNBACH.	

LAVAL

L. BARNÉOUD ET C^{ie}, IMPRIMEURS

1919

SÉRIE A, N° 849

N° D'ORDRE :

1614

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE THOMAS

PRÉPARATEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES
ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LES PROTÉIQUES DE LA LEVURE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *20* Juin 1919 devant la Commission d'examen



MM. LIPPMANN.	<i>Président</i>
URBAIN.	} <i>Examineurs</i>
FERNBACH.	

LAVAL

L. BARNÉOUD ET C^{ie}, IMPRIMEURS

1919

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... P. APPELL, *Profess.* Mécanique analytique et mécan. céleste.

Profess. honoraires. { P. PUISEUX.
VÉLAIN

Professeurs.....

LIPPMANN	Physique.
BOUTY.....	Physique.
BOUSSINESQ	Phys.mathém. et calcul des probabilités.
PICARD	Analyse supér. et algèbre supérieure.
Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie compar.
G. BONNIER	Botanique.
KOENIGS.....	Mécanique physique et expérimentale
GOURSAT.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
HALLER.....	Chimie organique.
JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
JANET.....	Physique
WALLERANT.....	Minéralogie.
ANDOYER.....	Astronomie.
PAINLEVÉ.....	Mécanique rationnelle.
HAUG	Géologie.
HOUSSAY.....	Zoologie.
H. LE CHATELIER.	Chimie.
G. BERTRAND....	Chimie biologique.
Mme P. CURIE.....	Physique générale.
CAULLERY.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés)
C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.
G. URBAIN.....	Chimie
EMILE BOREL	Théorie des fonctions.
MARCHIS.....	Aviation.
JEAN PERRIN.....	Chimie physique.
G. PRUVOT.....	Zoologie, anatomie, physiol. comparée
MATRUCHOT.....	Botanique.
ABRAHAM.....	Physique.
CARTAN.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
Cl. GUICHARD.....	Géométrie supérieure.
MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
LEBESGUE.....	Application de l'analyse à la géométrie.
LAPICQUE.....	Physiologie.
GENTIL.....	Géographie physique.
N.....	Mathématiques générales.
N.....	Histologie.

Professeurs-adjoints. {

LEDUC.....	Physique.
MICHEL	Minéralogie.
HEROUARD.....	Zoologie.
LÉON BERTRAND...	Géologie.
RÉMY PERRIER....	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
COTTON	Physique.
LESPIEAU.....	Chimie.
SAGNAC.....	Physique (Enseignement P. C. N.).
PEREZ.....	Zoologie (Evolution des êtres organisés).

Secrétaire..... D. TOMBECK.

A MA FEMME

NÉE CHARLOTTE FALK

Je dédie ce travail.

RECHERCHES BIOCHIMIQUES

SUR

LES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Ce travail comprend deux parties.

Dans une première, j'ai étudié l'assimilation de l'azote par la levure, en choisissant comme source d'azote les amides, et montré que ces corps rentrent dans le cas général, c'est-à-dire que leur azote est d'abord détaché sous forme d'ammoniaque avant d'entrer dans la constitution des protéiques qui forment le protoplasma. J'ai montré que l'assimilation de l'azote amidé s'accompagne d'une production notable d'acide formique.

Dans une seconde partie, j'ai étudié les protéiques qui peuvent être extraits du protoplasma de la levure, en passant successivement en revue leur préparation, leurs propriétés, leur origine. J'ai enfin étudié leurs principaux produits d'hydrolyse et examiné l'utilisation possible de ces protéiques.

INTRODUCTION

FORMATION DES PROTÉIQUES CHEZ LES VÉGÉTAUX

L'origine des protéiques (1) chez les végétaux reste mystérieuse. Nous connaissons l'origine des éléments : le carbone provient le plus souvent du gaz carbonique de l'air, quelquefois de combinaisons organiques ; l'hydrogène trouve sa source dans l'eau, l'oxygène dans l'atmosphère ou dans l'eau. L'azote est emprunté aux nitrates, aux sels ammoniacaux ou à divers composés organiques ; le soufre est pris aux sulfates et le phosphore aux phosphates.

La matière vivante prend naissance, au moins pour la plus grande partie, par fixation de l'azote des substances minérales (nitrates, sels ammoniacaux) sur des groupements ternaires, préexistants ou formés par l'assimilation chlorophyllienne. Mais nous ne savons presque rien des termes intermédiaires.

Cependant, il nous est à peu près impossible d'imaginer, d'après ce que nous connaissons aujourd'hui des protéiques, que leur synthèse ne soit pas précédée de celle des acides aminés qui les constituent. C'est donc en somme cette dernière synthèse qu'il nous faudrait expliquer.

Nous ne possédons ici que des hypothèses, tantôt vérifiées en partie par certains côtés, tantôt restant entièrement à vérifier.

(1) On ne dit plus guère « matières sucrées », mais sucres ; de même, on dit graisses pour matières grasses. On peut donc dire simplement « protéiques » pour matières protéiques, cette appellation correspondant au sens le plus général.

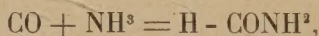
Il serait utile d'établir une classification au moins sommaire parmi les nombreuses explications proposées.

Plantes autotrophes

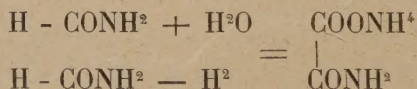
Prenons d'abord le cas des végétaux verts, dans lesquels, sous l'action de la lumière et en présence de ce complexe organo-magnésien qu'est la chlorophylle, prennent naissance les dérivés hydro-oxygénés du carbone, parmi lesquels toute une série de corps à chaînons hydroxylés qui constituent les saccharides. Nous pouvons grouper les réactions hypothétiques qui rendent compte de la formation des protéiques d'après l'origine de l'azote qu'elles utilisent (1).

A. Réactions dans lesquelles entre l'ammoniaque

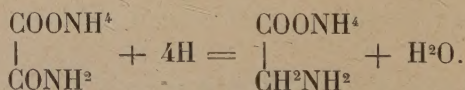
a) Si nous supposons, conformément à l'hypothèse de BAEYER, une décomposition de CO^2 en CO et O, nous pouvons admettre la réaction :



qui donne naissance à la formamide. Celle-ci, en présence d'eau, peut donner par perte d'hydrogène l'oxamate d'ammonium :

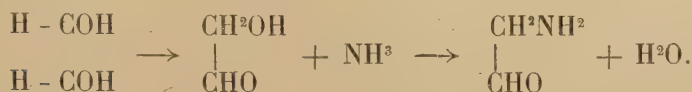


et ce dernier corps fournit par réduction le sel ammoniacal de l'acide aminoacétique, c'est-à-dire du glycolle :

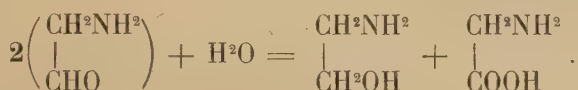


(1) Un exposé assez complet de ces hypothèses se trouve dans ABDERHALDEN, *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 3^e éd., Berlin 1914.

b) On peut considérer actuellement comme presque démontrée la formation transitoire de formaldéhyde, premier terme organique de l'assimilation chlorophyllienne. Deux molécules de ce corps donnent par condensation l'aldéhyde glycolique qui en présence d'ammoniaque se transforme en aminoacétaldéhyde :

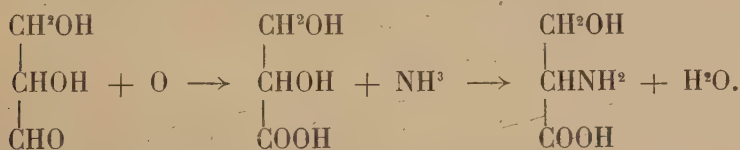


Deux molécules de celui-ci, en fixant H^2O , donnent alors une molécule d'alcool aminoéthylrique ou oxyéthylamine et une molécule de glycocolle (réaction de CANNIZZARO) :



Cette hypothèse, empruntée à G. TRIER (1), est étayée par la présence de l'alcool aminoéthylrique dans certaines plantes.

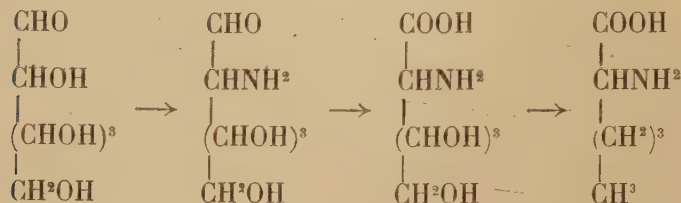
c) On peut obtenir, par condensation de trois molécules de formaldéhyde, l'aldéhyde glycérique ou glycérose, qui peut donner de la sérine, soit par le même mécanisme que ci-dessus, soit par oxydation en acide glycérique suivie d'une fixation d'ammoniaque ou « amination » :



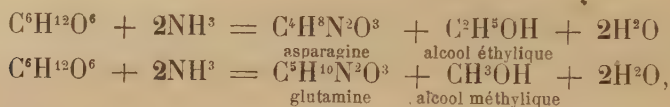
d) La condensation de six molécules de formaldéhyde fournissant un hexose, celui-ci peut conduire à la leucine linéaire ou norleucine par l'intermédiaire de la glucosamine et de l'acide glucosamique, ce dernier subissant une réduction qui

(1) G. TRIER, *Ueber einfache Pflanzenbasen und ihre Beziehungen zum Aufbau der Eiweissstoffe und Lecithin*. Berlin 1912.

transforme les chaînons CHOH en chaînons CH^2 et CH^2OH en CH^3 :



D'après E. SCHULZE (1), on peut aussi avoir par l'action de l'ammoniaque sur le glucose soit de l'asparagine, soit de la glutamine, c'est-à-dire les amides des acides aspartique et glutamique :

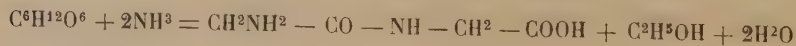


l'alcool éthylique ou méthylique formé en même temps étant ultérieurement brûlé (2).

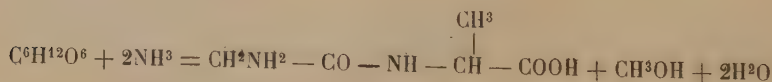
e) Presque toutes ces hypothèses ont pour point de départ le formaldéhyde ; on pourrait cependant partir d'autres combinaisons, comme l'acide pyruvique ou le méthylglyoxal, qui peuvent correspondre à des termes de passage, soit de la synthèse, soit de la dislocation des sucres. Ces corps ont entre eux et avec l'acide lactique des relations étroites et peuvent facilement se transformer les uns dans les autres, comme l'ont mon-

(1) E. SCHULZE, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 24, p. 18 (1898). Cependant, il est bien probable que la formation d'asparagine n'est pas en relation immédiate avec la synthèse des protéiques (PRIANISCHNIKOW, *Ber. deut. botan. Gesell.*, t. 22, p. 33 (1904) ; E. SCHULZE, *Id., ibid.*, p. 331).

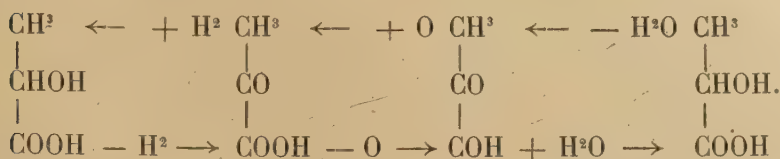
(2) On pourrait aussi, par une réaction analogue, admettre la formation de glycyl-glycine :



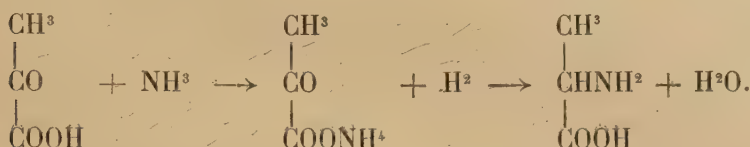
ou de glycyl-alanine :



tré tout un ensemble de recherches récentes sur le mécanisme de la fermentation alcoolique :



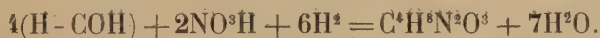
Ainsi, par exemple, on a, en faisant réagir l'ammoniaque sur l'acide pyruvique :



On arrive ainsi à l'alanine, mais un grand nombre d'acides aminés pouvant être considérés comme des β -dérivés de l'alanine (sérine, cystéine, etc.), ce mode de synthèse a une portée assez générale.

B. Réactions dans lesquelles intervient l'azote nitrique

a) On admet presque toujours que l'acide nitrique est réduit par la plante en acide nitreux, puis en ammoniaque. On pourrait ainsi arriver à l'amide aspartique ou asparagine en partant de quatre molécules de formaldéhyde :



b) En supposant, avec BACH (1), que les termes successifs de la réduction de l'acide nitrique sont NO^2H , NOH et $\text{NH}=\text{NH}$, on peut arriver au même résultat, c'est-à-dire formation d'asparagine :



c) Le problème de la réduction des nitrates a été serré d'un

(1) BACH, *C. R. Acad. Sciences*, t. 122, p. 1499 (1896).

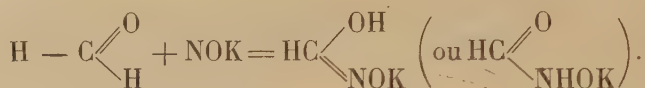
peu plus près par BAUDISCH (1). Il a observé que les nitrates et nitrites sont facilement réduits par la lumière solaire (ou les radiations ultra-violettes) en présence d'alcool méthylique ou de formaldéhyde. Il se formerait un groupe nitrosyle $=N.OH$

ou $=N \begin{smallmatrix} O \\ // \\ H \end{smallmatrix}$, analogue au groupement aldéhydique $-C \begin{smallmatrix} O \\ // \\ H \end{smallmatrix}$.

En faisant agir la lumière sur un mélange d'alcool méthylique et de nitrite de potassium, il se dégage de l'oxygène qui oxyde l'alcool :



L'aldéhyde formique ainsi produit réagit sur le potassium-nitrosyle avec formation du sel potassique de l'acide formohydroxamique :



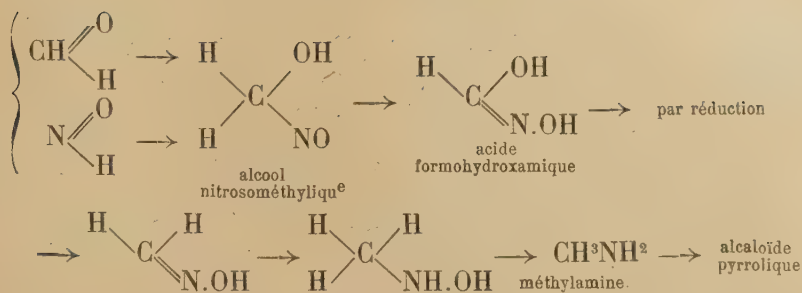
Il se fait sans doute comme produit intermédiaire de l'alcool nitrosométhylrique. L'acide formohydroxamique disparaît peu à peu et on peut extraire du liquide de la méthylamine, ainsi qu'un alcaloïde pyrrolrique ou pyrrolidrique à odeur de nicotine.

Pour BAUDISCH, l'assimilation des nitrates par les plantes vertes serait un processus photochimique : de même que les radiations rouges et orangées du spectre réduisent l'acide carbonique CO^2H^2 en aldéhyde formique $H-COH$, les radiations bleues, violettes et ultra-violettes réduisent les nitrates en nitro-

syle $=N \begin{smallmatrix} O \\ // \\ H \end{smallmatrix}$ analogue au groupement aldéhyde $-C \begin{smallmatrix} O \\ // \\ H \end{smallmatrix}$. On

aurait alors la série suivante qui permettrait de passer aux alcaloïdes :

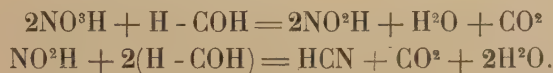
(1) BAUDISCH, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 44, p. 1009 (1911) ; t. 45, p. 1771 et 1775 ; t. 46, p. 115.



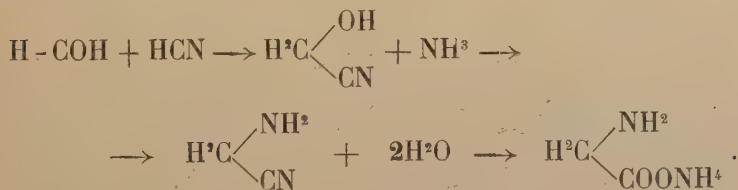
Il est à noter que les plantes vertes peuvent se nourrir d'amines assez simples : méthylamine, éthylamine, comme l'a montré LUTZ (1).

C. Réactions dans lesquelles intervient l'acide cyanhydrique

a) On peut se représenter la formation d'acide cyanhydrique par les deux réactions suivantes :



Le nitrile ainsi obtenu pourrait, suivant la réaction classique, donner les divers acides aminés en s'unissant à l'ammoniaque et à l'aldéhyde correspondant; avec l'aldéhyde formique, on aurait le glycocolle :



De même, avec l'aldéhyde acétique, on aurait l'alanine; avec l'isovaléraldéhyde, la leucine, et ainsi de suite, de sorte que la

(1) LUTZ, *Thèse*, Paris 1909, p. 224.

réaction a une portée générale, à condition que se trouvent présents les aldéhydes nécessaires.

b) Le nitrile formique peut aussi prendre naissance aux dépens d'un sucre, avec production d'oxalate de potassium et mise en liberté d'oxygène (1) :



On voit que l'acide cyanhydrique, en s'unissant au formaldéhyde, donnerait :



c'est-à-dire un chaînon d'acide aminé, capable de produire l'un ou l'autre de ces acides, ou même des peptides. Ainsi, pour la glycylglycine, on pourrait envisager une réaction telle que :



*
**

On admet que la lumière (radiations les plus réfrangibles du spectre) a une action prépondérante dans la formation des protéiques (hypothèse de SCHIMPER (2), en 1888). « Pendant la nuit, « la feuille élaborerait, aux dépens de l'azote minéral, des « composés amidés ; ceux-ci, à la lumière solaire, se transfor- « meraient en composés protéiques (3) ». Certains auteurs, ZALESKI entre autres (4), pensent au contraire que la lumière ne joue aucun rôle essentiel dans l'assimilation de l'azote : en présence de sucre, en effet, la synthèse des protéiques a lieu à l'obscurité ; il en est de même dans les graines.

La lumière n'intervient pas dans les phénomènes de synthèse chez les plantes autotrophes si on leur donne du sucre en présence de certains composés azotés, urée, glycocolle,

(1) G. ANDRÉ, *Chimie végétale*, Paris 1898.

(2) SCHIMPER, *Botan. Zeitung*, t. 46, p. 65 (1888).

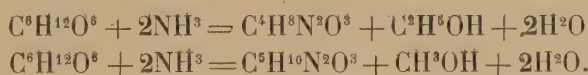
(3) G. ANDRÉ, *loc. cit.*, p. 222.

(4) ZALESKI, *Botan. Centralbl.*, t. 87, p. 277 (1900).

asparagine, glutamine ; c'est ce qui résulte des expériences de HANSTEEN (1), qui sont malheureusement critiquables à plusieurs points de vue et mériteraient d'être reprises.

Lors de la germination, il y a dislocation des protéiques de la graine, puis de nouveau reconstruction dans la jeune plante. « Les protéiques de la graine sont décomposés en fragments « (acides aminés). Si la germination a lieu à la lumière, les « amides ne s'accumulent pas dans la plante parce qu'elles « sont retransformées en protéines dans les régions où a lieu la « nouvelle formation ; mais si elle a lieu à l'obscurité, les « amides, en particulier l'asparagine, s'accumulent (2) ». Il se fait ainsi de l'asparagine et de la glutamine, tandis que les produits de l'hydrolyse des protéines sont surtout les acides aspartique et glutamique. Les amides résulteraient de l'oxydation de ces acides aminés (3). Les proportions sont aussi très différentes, sans doute parce que les corps autres que les deux amides susnommées sont utilisés de suite, même à l'obscurité.

E. SCHULZE a d'ailleurs montré que les acides aminés provenant des protéiques sont décomposés dans la plante, l'ammoniaque qui en résulte pouvant donner avec le sucre de l'asparagine et de la glutamine, selon les équations déjà indiquées (p. 6) :



Il est à noter que d'après HANSTEEN (*loc. cit.*), l'alanine, la leucine, ne conviennent pas à la synthèse des protéiques dans la plante aussi bien que l'asparagine, la glutamine et l'urée.

Les amides sont rapidement transformées en protéiques dans les germes, à la lumière, mais seulement dans une atmosphère contenant du gaz carbonique : preuve que cette synthèse est

(1) HANSTEEN, *Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik*, t. 33, p. 417 (1899).

(2) JOST, *Pflanzenphysiologie*, trad. anglaise de Gibson, Oxford 1907, p. 173.

(3) G. ANDRÉ, *loc. cit.*, p. 377.

liée à la formation des hydrates de carbone par l'assimilation chlorophyllienne.

Plantes hétérotrophes

Examinons à l'aide de ces faits ce qui se passe chez les plantes hétérotrophes. Chez les végétaux non chlorophylliens, qui ont à leur disposition du glucose, mais non de l'aldéhyde formique, et qui peuvent néanmoins emprunter leur azote aux nitrates et à l'ammoniaque (champignons inférieurs), ou à l'ammoniaque seulement (levure), les réactions indiquées précédemment ne peuvent être toutes admises. En particulier, il est probable que celles dans lesquelles l'aldéhyde formique joue un rôle essentiel doivent être éliminées. Il reste alors comme réactions pouvant conduire à la formation des acides aminés :

a) La fixation de l'ammoniaque sur un sucre en C^6 , donnant d'abord de la glucosamine (1), ce corps pouvant être ensuite réduit jusqu'à la norleucine (voir A, d);

b) L'« amination » des acides cétoniques tels que l'acide pyruvique, qui peut provenir de la décomposition des sucres servant d'aliments à la plante (A, e). L'acide pyruvique, en particulier, est produit par la levure, comme l'a montré A. FERNBACH (2) et son importance apparaît comme de plus en plus considérable dans le métabolisme des hydrates de carbone et des protéiques, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux ;

c) Pour les champignons qui utilisent l'azote nitrique, il peut y avoir d'abord réduction à l'état d'ammoniaque, qui est ensuite utilisée. On retombe alors sur un des cas précédents.

(1) Cette réaction se produit très vraisemblablement chez les champignons dont l'enveloppe cellulaire contient de la chitine (dérivé de la glucosamine) ou des produits azotés intermédiaires entre la cellulose et la chitine.

(2) A. FERNBACH et M. SCHÖN, *C. R. Acad. Sciences*, t. 457, p. 1478 (1913).

Il est à remarquer, en effet, que si l'on peut admettre chez certaines plantes vertes et dans certains cas une synthèse des acides aminés par l'intermédiaire de l'acide cyanhydrique, démontrée d'ailleurs par les recherches de TREUB (1), cette hypothèse est plus difficilement soutenable chez les végétaux sans chlorophylle, ou ce corps n'a pas encore été constaté. On ne connaît pas de bactéries qui produisent de l'acide cyanhydrique, et les glucosides qui dérivent de ce produit n'existent pas chez les champignons, bien que ceux-ci semblent particulièrement aptes à sécréter les ferments hydrolysant ces mêmes glucosides.

Un grand nombre de végétaux hétérotrophes empruntent leur azote à des produits organiques plus ou moins complexes, depuis les amides voisines des sels ammoniacaux, jusqu'aux protéiques les plus compliqués, en passant par les peptides et les acides aminés. On trouve généralement que les aliments complexes sont simplifiés par le jeu de ferments appropriés, de telle sorte que les protéiques, par exemple, sont ramenés aux acides aminés qui les constituent. Dans bien des cas, le mécanisme simplificateur est encore inconnu (utilisation des alcaloïdes, des noyaux hétérocycliques, etc.).

Quoi qu'il en soit, beaucoup de plantes, en consommant les protéiques, ne s'arrêtent pas au stade acide aminé, mais vont d'emblée jusqu'à l'ammoniaque : c'est le cas de l'*Aspergillus niger*, étudié par BUTKEWITSCH (2), et de nombreuses bactéries. On peut facilement faire pousser des moisissures sur des milieux contenant des acides aminés ou des peptides comme unique source d'azote ; l'*Asp. niger* pousse très bien sur de tels substratums. Il forme ses protéiques indépendamment de l'aliment azoté fourni, c'est-à-dire que leur composition n'est pas influencée par la nature de l'acide aminé fourni ainsi que l'ont montré ABDERHALDEN et RONA (3). Il paraît évident que dans ce

(1) TREUB, *Ann. Jardin bot. Buitenzorg*, t. 13, p. 1 (1895) ; *ibid.*, 2^e sér., t. 4, p. 86 (1905).

(2) BUTKEWITSCH, *Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik*, t. 38, p. 147 (1903).

(3) ABDERHALDEN et RONA, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 46, p. 179 (1905).

cas l'azote de l'acide aminé est détaché sous forme d'ammoniaque. Dans le cas des peptides, il y a hydrolyse préalable, puis en général « désamination ». La levure n'agit pas autrement lorsque l'azote lui est fourni sous forme d'acides aminés : le mécanisme est peut-être un peu plus compliqué, il y a rupture du chaînon terminal et formation d'un alcool contenant un chaînon carboné en moins, mais en fin de compte on aboutit encore à une désamination (1).

Si on généralise, on voit qu'une conclusion — possible, mais non nécessaire — peut être tirée de ce qui précède : c'est qu'un corps azoté donné paraîtra un aliment d'autant meilleur qu'il fournira plus facilement son azote à l'état d'ammoniaque (sous réserve, bien entendu, qu'il ne se forme pas en même temps de produits toxiques ou capables de gêner l'assimilation de l'ammoniaque). Cette désamination préalable des corps azotés plus ou moins complexes fournis au végétal, avant toute utilisation de l'azote, nous ramène aux deux cas *a* et *b* (voir plus haut, p. 12).

NÆGELI pensait que la constitution chimique des aliments joue un grand rôle dans leur faculté d'assimilation par les plantes (2), mais cette constitution n'a pas, d'après ce qui précède, l'importance qu'il lui supposait, au moins pour les aliments azotés (3).

En résumé, il faudrait donc admettre que *chez les végétaux hétérotrophes, l'assimilation de l'azote, que celui-ci soit donné sous forme minérale (sels ammoniacaux, nitrates) ou organique (protéiques, peptides, acides aminés, amides, amines, noyaux divers), revient toujours en définitive à une formation préalable d'ammoniaque, qui se fait ensuite sur le sucre ou un de ses produits de transformation.*

Cette conclusion est sans doute valable dans la plupart des cas. Mais il est bien probable qu'il y a, comme chez les plantes autotrophes, plusieurs modalités dont certaines nous sont

(1) F. EHRLICH, *Zeits. d. Ver. d. deut. Zuckerind.*, t. 55, p. 539 (1905).

(2) NÆGELI, *Botan. Mittheil.*, t. 3, p. 395 (1879).

(3) JOST, *loc. cit.*, p. 180.

encore inconnues. Autrement, nous ne comprendrions pas pourquoi certains organismes préfèrent les nitrates aux sels ammoniacaux (*Alternaria tenuis*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus glaucus*, *Bacillus pyocyaneus*) (1). D'autre part, si les nitrates sont toujours réduits au préalable à l'état d'ammoniaque, il faut admettre que cette réduction est possible à *B. coli* et *B. subtilis* en présence de glucose et non en présence de glycérine, puisque, d'après A. FISCHER, ces bactéries utilisent les nitrates en présence du sucre et ne peuvent utiliser que les sels ammoniacaux en présence de glycérine (2).

Je tiens à remercier M. A. FERNBACH de l'accueil bienveillant qu'il a réservé à mon travail, dont la première partie a été faite dans son laboratoire de l'Institut Pasteur. Je remercie également ma dévouée collaboratrice, Mme S. KOŁODZIEJSKA, qui m'a aidé de son habileté et de son travail minutieux et assidu dans l'exécution de la seconde partie.

Je désire exprimer à M. le Dr ROUX, Directeur de l'Institut Pasteur, et à M. VALLERY-RADOT, toute ma reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes recherches.

J'ai trouvé auprès de M. HOUARD, Professeur à la Faculté des Sciences de Caen, l'accueil le plus cordial; je lui en exprime ici tous mes remerciements.

(1) JOST, *loc. cit.*, p. 181.

(2) A. FISCHER, *Vorlesungen über Bakterien*, Léna 1897, p. 53.

PREMIÈRE PARTIE

NUTRITION AMIDÉE DE LA LEVURE : FORMATION DES PROTÉIQUES

CHAPITRE PREMIER

UTILISATION DES AMIDES PAR LA LEVURE

Si la conclusion énoncée plus haut est exacte, l'assimilation de l'azote d'un composé organique se fera d'autant mieux qu'il donnera plus facilement de l'ammoniaque. Cette dernière propriété devra donc conférer au corps la qualité d'aliment de choix pour les plantes hétérotrophes.

Parmi les corps azotés les plus susceptibles de fournir leur azote à l'état d'ammoniaque, les amides se placent au premier rang. Il s'agissait donc de voir si la levure peut construire son protoplasma, ou en général ses protéiques, lorsque l'azote lui est fourni exclusivement sous forme amidée, et si elle s'accommode d'une telle alimentation. De très nombreux expérimentateurs ont montré déjà que l'asparagine est un excellent aliment azoté pour la levure et pour beaucoup d'autres microorganismes. Mais l'asparagine est un corps à fonction multiple, à la fois amide par son groupement terminal — CONH^2 et acide aminé par l'acide aspartique dont elle dérive. Il faut bien avouer aussi que tant de renseignements souvent contradictoires ont été accumulés sur le rôle de l'asparagine vis-à-vis de la levure qu'il devient bien difficile de s'y reconnaître ;

il ne faut pas songer à dégager le rôle du groupement amidé de l'asparagine dans toute cette confusion.

Il est préférable de choisir une amide plus simple comme matériel d'étude ; l'urée, si facilement attaquée par les organismes qui se développent dans l'urine et transformée par eux en carbonate d'ammonium, comme l'ont montré les recherches classiques de VAN TIEGHEM (1), était tout indiquée. J'ai donc commencé par étudier les cultures de levure sur milieux à urée ; je me suis naturellement attaché à déterminer, par des analyses précises, les variations du sucre et de l'azote, la quantité de végétal formé, etc. La levure, en raison de sa culture facile et de son isolement commode par simple filtration, se prête parfaitement à toutes les déterminations analytiques ; on peut en particulier en déterminer la quantité par simple pesée. De plus, son développement est extrêmement rapide et sa plasticité vis-à-vis des divers milieux est considérable.

Avant d'entrer dans le détail des expériences, il nous faut d'abord préciser les termes du problème. On sait depuis PASTEUR que, loin de se former dans la fermentation alcoolique comme le croyaient les anciens auteurs, l'ammoniaque disparaît pendant la fermentation. De ce fait, PASTEUR conclut que « l'ammoniaque se transforme dans la matière albuminoïde « complexe qui entre dans la constitution de la levure, en « même temps que les phosphates donnent aux globules nouveaux leurs aliments minéraux. Quant au carbone, il est évidemment fourni par le sucre » (2).

Dans sa thèse intitulée : « Etudes relatives à l'absorption de l'ammoniaque et à la production d'acides gras volatils pendant la fermentation alcoolique », DUCLAUX (3) démontre que l'ammoniaque n'est pas entraînée par le dégagement gazeux, comme l'avait prétendu MILLON, mais que la quantité d'azote ammoniacal qui disparaît se retrouve dans la levure nouvellement formée et dans ses produits d'excrétion.

(1) VAN TIEGHEM, *Thèse*, Paris 1862.

(2) PASTEUR, *Ann. Chim. et Physique*, 3^e sér., t. 58, p. 383 (1859).

(3) DUCLAUX, *Thèse*, Paris 1865.

On a donc le droit, lorsque l'on a fourni à la levure une certaine quantité d'azote sous une forme simple (ammoniaque, urée, etc.) d'admettre que tout l'azote qui ne peut plus être retrouvé sous cette forme a été utilisé par le végétal et transformé par passage à travers la matière vivante.

Plus tard, DUCLAUX est amené à préciser une notion nouvelle. La levure est un végétal qui prolifère et se développe dans le milieu de culture, et qui fait un choix, parmi les sources d'azote qu'on lui offre, pour la construction de ses tissus. D'autre part, cultivée avec un accès plus ou moins limité d'air, elle fait fermenter le sucre et semble proliférer d'autant moins qu'elle se montre un ferment plus énergique ; on a donc à distinguer entre la *levure végétal* et la *levure ferment*. Telle source d'azote qui favorisera la multiplication du végétal pourra en revanche être moins favorable à son « pouvoir ferment », soit que le protoplasma qu'elle contribue à former ne puisse produire une zymase aussi active ou aussi abondante, soit que le sucre fourni à la plante en même temps que cette source d'azote soit surtout utilisé à la construction de nouveaux tissus.

Etant donné le but poursuivi, il est évident que nous devons nous occuper avant tout de la levure végétal. Bien mieux, nous nous efforcerons de nous placer dans les conditions les plus favorables à son développement, tout en éliminant autant que possible l'action de l'aliment azoté étudié sur le pouvoir ferment.

Dispositif expérimental employé

PASTEUR a montré que l'on peut expérimenter avec la levure sans qu'elle agisse comme ferment alcoolique d'une manière appréciable lorsqu'on opère en couche extrêmement mince, de façon à produire le maximum d'aération (1). En poussant à

(1) PASTEUR, *Etudes sur la Bière*, Paris 1876, p. 229 et suiv.

l'extrême sa méthode, il a pu, en opérant dans une cuvette plate où le liquide avait une épaisseur de deux à trois millimètres, obtenir en 48 heures un poids de 0 gr. 127 de levure pour 1 gr. 04 de saccharose disparu, soit un rapport de $1/8$ (en arrêtant l'expérience après 24 heures, le rapport pouvait même atteindre $1/4$) ; la quantité d'alcool produite était inappréciable.

Je me suis inspiré de ces expériences et, sur les conseils de DUCLAUX, j'ai opéré dans de grands ballons FERNBACH, à fond plat et à tubulure latérale. Ces ballons sont tels qu'on y peut placer 250 à 300 cc. de liquide de culture sans que l'épaisseur dépasse un centimètre. Enfin, en exerçant une aspiration par la tubulure latérale, on peut y faire circuler un courant d'air qui augmente encore l'aération.

Il va sans dire que ces expériences ont été faites avec des levures pures et des milieux stérilisés au préalable, de manière à se mettre à l'abri de toute contamination accidentelle.

En raison de la nature des aliments azotés en expérience, la stérilisation et la préparation des milieux de culture ont été faites, pour les expériences définitives, avec les précautions suivantes (1), dont les recherches qui vont être exposées ont démontré la nécessité :

J'ai toujours opéré avec des solutions artificielles formées de sels minéraux, de sucre et de l'aliment azoté choisi, afin d'éviter les corps mal définis dont l'action vient interférer avec celle des substances étudiées. La solution minérale, faite avec de l'eau ordinaire (qui apporte avec elle une certaine proportion de chaux utile à la levure), contient 2,5 p. 1.000 de phosphate bipotassique $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ et 0,5 p. 1.000 de sulfate de magnésium. On y dissout une certaine quantité de glucose pur (et non de saccharose pour éviter à la levure l'intervention de ce dernier) et on l'introduit par portions de 300 cc., mesurées exactement, dans des ballons FERNBACH à fond plat et à tubu-

(1) P. THOMAS, *C. R. Acad. Sciences*, t. 133, p. 312 (1901).

lure latérale, où la solution occupe une épaisseur ne dépassant pas un centimètre. Après stérilisation à l'autoclave, à une température de 110° , et refroidissement, on introduit, en prenant les précautions d'asepsie convenables, la quantité voulue d'une solution de la substance azotée en expérience, préalablement stérilisée par filtration à la bougie CHAMBERLAND. Cette précaution est nécessaire, parce que la plupart des amides sont hydrolysées par le chauffage de leurs solutions à l'autoclave.

D'autre part, on prépare une culture pure de levure (1) dans un milieu quelconque, tel que l'eau de touraillons sucrée. Lorsque la fermentation est terminée, la levure se dépose ; on décante le liquide, on délaie le dépôt dans un peu d'eau stérile que l'on décante rapidement à deux reprises, et on enseme avec une quantité exactement mesurée de l'émulsion de levure, rendue homogène par agitation. Une quantité égale étant versée sur un filtre taré, on peut, après essorage et dessiccation à 105° jusqu'à poids constant, connaître la quantité de levureensemencée.

Après fermentation, on filtre sur un filtre taré, on lave la levure sur le filtre avec une petite quantité d'eau, dont le volume est déterminé, et on complète le liquide filtré à 500 cc. Il devient dès lors facile de connaître le poids de levure formé, ainsi que les variations du sucre, de l'azote, etc. par comparaison avec le témoin.

Lorsqu'il s'agit de faire des expériences de comparaison, les ballons sontensemencés avec une même quantité de levure et placés dans une étuve à température réglée.

J'ai préféré, pour apprécier l'action des corps étudiés sur le végétal levure, mesurer le poids de la récolte plutôt que faire la numération des cellules produites. En effet, outre les causes d'erreur très manifestes inhérentes à toutes les méthodes de numération, celles-ci ne peuvent tenir compte d'un facteur

(1) La levure qui a servi à la plupart de ces expériences est une levure de vin de la collection du laboratoire de fermentations de l'Institut Pasteur, désignée par les lettres ML.

important, à savoir la grosseur relative des cellules. Cette grosseur varie dans d'assez grandes proportions, surtout avec les milieux artificiels formés de corps définis. D'autre part, connaissant le poids de levure, il est facile d'y rapporter les variations pondérales de composition du milieu employé, et les résultats y gagnent en netteté.

Méthodes analytiques employées

J'indiquerai très brièvement les méthodes que j'ai utilisées, me réservant de donner des indications détaillées sur la méthode de dosage de l'ammoniaque que j'ai étudiée et que j'ai été conduit à adapter particulièrement à mes recherches.

1° *Dosage du sucre.* — Ce dosage a été fait au moyen d'une liqueur de FEHLING titrée, tantôt par simple décoloration, tantôt par le procédé de LEHMANN modifié par MAQUENNE, avec titrage à l'hyposulfite (1).

2° *Dosage de l'alcool.* — On distille 50 cc. du liquide de culture, préalablement neutralisé. Le liquide recueilli, amené au volume primitif, est examiné au moyen du compte-gouttes de DUCLAUX (2). On peut ainsi mesurer avec une précision suffisante les petites quantités d'alcool produites.

3° *Azote de la levure.* — La levure recueillie sur filtre taré étant pesée, on introduit le filtre et son contenu dans un ballon, on ajoute de l'acide sulfurique, un globule de mercure, et on procède comme dans la méthode ordinaire de KJELDAHL.

4° *Azote total du liquide.* — Ce dosage est fait comme ci-dessus, sur 50 cc. du liquide préalablement évaporés au bain de sable en présence d'un peu d'acide sulfurique.

5° *Dosage de l'azote ammoniacal.* — Ce dosage est particulièrement délicat, car il doit être effectué souvent en présence de matières azotées facilement décomposables, amides, pro-

(1) MAQUENNE, *Bull. Soc. Chimique*, 3^e sér., t. 19, p. 926 (1898).

(2) E. DUCLAUX, *Ann. Chim. et Physique*, 5^e sér., t. 2, p. 233 (1874).

duits d'autolyse mal connus, susceptibles de dégager de l'ammoniaque si on opère sans précautions spéciales. Les résultats obtenus ne peuvent prendre leur valeur que si ce dosage est rigoureux ; j'y ai donc apporté des soins tout particuliers.

J'ai d'abord essayé, pour le dosage de l'ammoniaque en présence d'urée (celle-ci étant la plus facilement altérable des amides étudiées) la distillation avec la magnésie.

La magnésie employée a été chauffée au rouge sombre, au four à moufle, dans des capsules plates, afin de chasser l'ammoniaque qui peut s'y trouver. Après un temps suffisant, on laisse refroidir et on enferme la poudre encore très chaude dans des flacons séchés à 105° et encore chauds.

L'urée utilisée avait été recristallisée à plusieurs reprises dans l'alcool chaud. Sa solution dans l'eau ne donnait absolument rien avec le réactif de NESSLER.

J'ai fait alors les essais suivants :

a) 5 grammes de magnésie sont bouillis avec 300 cc. d'eau redistillée dans le ballon de l'appareil SCHLÖESING ; on recueille dans 10 cc. d'acide sulfurique décime. Après titrage, on ne trouve pas la plus légère trace d'ammoniaque.

b) 5 grammes de magnésie et 10 cc. d'une solution d'urée à environ 8,70 p. 100 sont bouillis avec 300 cc. d'eau pendant une demi-heure ; on recueille 1 mgr. 80 d'azote ammoniacal. Le dosage de l'azote dans la solution d'urée, par hydrolyse sulfurique et distillation, indique 32 mgr. 90 d'azote pour les 10 cc. employés. Au bout d'une demi-heure de distillation, la magnésie a donc dégagé environ 3,5 p. 100 de l'azote de l'urée.

J'ai alors essayé d'opérer la distillation dans le vide. D'autre part, afin de se placer dans les conditions des expériences à réaliser, il était indispensable de voir si la formation de phosphate ammoniaco-magnésien ne peut troubler le dosage.

L'expérience a été disposée de la manière suivante :

On a fait une solution A de tartrate neutre d'ammonium, une d'urée B, une autre C de phosphate ammoniaco-magnésien

dissous dans l'acide tartrique ; on a alors procédé aux dosages qui suivent :

1° On mélange 10 cc. de A, B et C, on attaque par l'acide sulfurique et on distille avec de la soude, sous la pression ordinaire.

Trouvé : Azote total. . . . 94,50 mgr.

2° 10 cc. de solution de tartrate d'ammonium A sont bouillis avec 5 grammes de magnésie et une quantité suffisante d'eau, dans le vide, à une température de 40° à 45°.

Azote. . . . 41,30 mgr.

3° 10 cc. de solution d'urée B, hydrolysés par l'acide sulfurique, sont distillés avec de la soude, sous la pression ordinaire.

Azote. . . . 37,80 mgr.

4° 10 cc. de solution A et 10 cc. de solution B sont distillés avec la magnésie, dans le vide.

Azote. . . . 41,30 mgr.

La distillation dans le vide en présence de magnésie n'altère donc pas l'urée. D'ailleurs, le résidu, repris et hydrolysé par l'acide sulfurique, donne par distillation avec la soude :

Azote. . . . 37,33 mgr. (1)

5° 10 cc. de solution de phosphate ammoniaco-magnésien C sont distillés avec de la soude tant qu'il passe de l'ammoniaque.

Azote. . . . 16,10 mgr.

6° 10 cc. de chacune des trois solutions A, B et C sont bouillis en présence de magnésie, dans le vide, à 40°-45°.

Azote. . . . 49,70 mgr.

La quantité totale d'azote ammoniacal étant de 41,30 + 16,10

(1) Au lieu de 37,80 mgr.

= 57,40 mgr., on voit que le phosphate ammoniaco-magnésien ne subit qu'une décomposition partielle dans ces conditions. La méthode n'est pas applicable, par conséquent, au dosage de l'azote ammoniacal en présence de phosphates, mais elle s'applique au contraire parfaitement si on prend soin d'éliminer au préalable l'acide phosphorique. J'ai suivi, dans ce but, les indications de FRÉSÉNIUS (1).

Voici finalement le mode opératoire auquel je me suis arrêté : A 50 ou 100 cc. du liquide en expérience, exactement mesurés, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique pur, puis de l'acétate neutre de plomb, en solution à 10 p. 100, jusqu'à cessation de précipité. On ajoute alors un peu de carbonate de plomb en poudre fine, on agite et on laisse digérer pendant 15 à 18 heures. On jette sur filtre, on lave soigneusement le dépôt à l'eau froide ; le liquide renferme tout l'azote ammoniacal.

Ce liquide est introduit avec 5 gr. de magnésie dans un ballon à fond rond, muni latéralement d'une tubulure très courte, par laquelle plonge un tube effilé, relié au moyen d'un caoutchouc épais avec le tube de rentrée d'air. Ce dernier est lui-même en relation avec un barboteur contenant de l'acide sulfurique au 1/4 destiné à arrêter les traces d'ammoniaque contenues dans l'air. Le caoutchouc porte une pince à vis qui permet de régler la rentrée de l'air.

Le ballon étant adapté à un appareil de SCHLÖESING-AUBIN, on fixe au réfrigérant vertical de celui-ci un tube de verre à ampoule qui plonge dans une fiole conique en verre épais contenant une quantité exactement connue et en excès d'acide sulfurique titré (10 cc. d'acide normal). On fait le vide par la tubulure latérale de cette fiole et on chauffe le ballon au bain-marie. On règle alors la rentrée d'air de façon à obtenir des bulles capables d'entretenir une ébullition assez calme, tout en maintenant la magnésie en suspension. On recueille environ

(1) FRÉSÉNIUS, *Traité d'analyse chimique quantitative*, trad. Gautier, 7^e éd. fr., Paris, p. 348.

120 à 150 cc. de liquide, ce qui demande à peu près 35 à 40 minutes, en ayant soin de refroidir convenablement le réfrigérant par un courant d'eau suffisant (fig. 1).

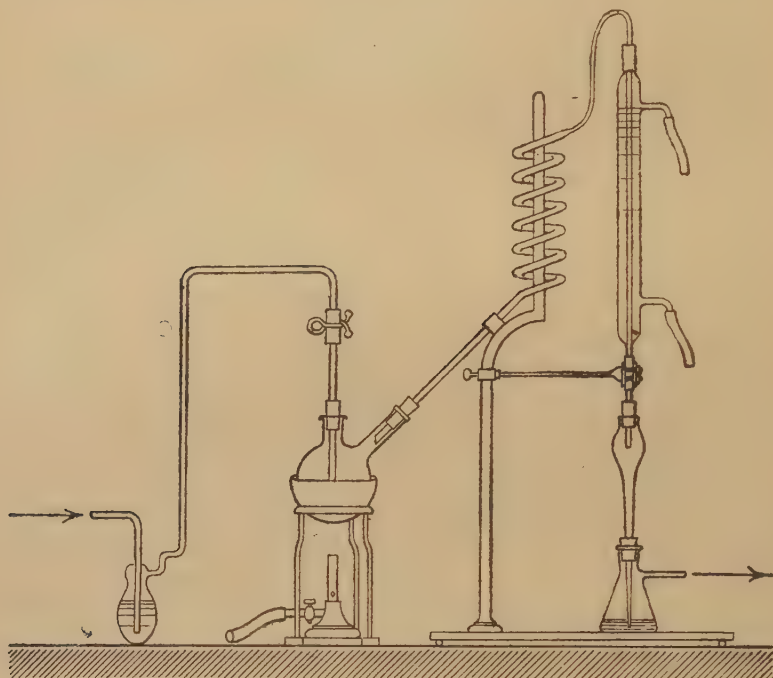


Fig. 1. — Appareil pour le dosage de l'ammoniaque.

Le contenu de la fiole conique est alors versé dans un ballon jaugé de 250 cc. ; on complète jusqu'au trait avec le liquide de lavage et on titre à la soude décime sur 25 à 50 cc. Le titrage est fait à une température voisine de l'ébullition, avec le tournesol d'orecine comme indicateur. Il est bon de faire au préalable un essai à blanc pour vérifier la concordance des liqueurs titrées.

Voici le résultat d'une expérience de contrôle faite par ce procédé. On a préparé trois solutions : A de tartrate neutre d'ammonium, B d'urée, C de phosphate ammoniaco-magnésien (dans l'acide tartrique).

	mgr. d'azote	mgr. d'azote
I. — 10 cc. de A, distillés avec la soude (pression ordinaire).	96,6	} 211,4
II. — 10 cc. de B, hydrolysés et distillés avec la soude (pression ordinaire) . . .	100,1	
III. — 10 cc. de C, distillés avec la soude (pression ordinaire).	14,7	
IV. — 10 cc. de A, distillés avec la magnésie (dans le vide)	96,6	
V. — 10 cc. de A + 10 cc. de B, avec la magnésie (dans le vide)	96,6	
VI. — 10 cc. de A, B et C, hydrolysés et distillés comme en II		211,1
VII. — 10 cc. de A, B et C, par la méthode indiquée ci-dessus.	112,0 (1)	
VIII. — Le résidu de VII, évaporé, hydrolysé et distillé avec la soude.	99,4	

On voit donc que l'azote ammoniacal est obtenu en totalité par cette méthode. Le petit excès du dosage VII sur la somme I + III, qui n'atteint que 0,7 mgr., correspond à un demi-dixième de centimètre cube de soude décime ; il ne dépasse donc pas l'erreur possible de lecture. On trouve aussi qu'il y a en VIII, par comparaison avec le dosage II, une perte de 0,7 mgr. d'azote, correspondant à la même erreur. Il n'est d'ailleurs guère possible d'évaporer le résidu de la distillation du dosage VII, attaquer par l'acide sulfurique et distiller avec la soude sans s'exposer dans une opération si longue à une perte légère. En tout cas, je ne pense pas que la différence observée puisse être attribuée à une décomposition de l'urée dans l'opération VII. Cette décomposition, si même elle était prouvée, serait d'ailleurs de l'ordre des erreurs de lecture et si infime qu'elle ne pourrait être considérée comme nuisant à l'exactitude du dosage (2).

(1) Au lieu de la somme de I et III, qui est de $96,6 + 14,7 = 111,3$.

(2) Cette méthode, étudiée par moi en 1898, a été utilisée pour les recher-

Recherches faites avec l'urée

Si la levure utilise de préférence comme aliments azotés les corps capables de se transformer facilement en dérivés ammoniacaux, elle doit pouvoir se développer aux dépens de l'urée, qui subit si aisément l'hydrolyse en donnant du carbonate d'ammonium.

Les seules données expérimentales qui existent sur ce sujet sont celles de MAYER (1) et de BEIJERINCK (2). Le premier admet que l'urée peut servir d'aliment à la levure, bien que la fermentation obtenue soit très lente ; le second pense qu'elle n'est pas utilisable par ce végétal. D'autre part, PASTEUR avait montré que l'albumine ne convient pas à la levure en vie anaérobie, MAYER trouvant, au contraire, que le sérum sanguin permet la fermentation. Les aliments azotés seraient donc parmi les matériaux dialysables du sérum : c'est justement l'urée qui en forme la partie principale (0 gr. 15 à 0 gr. 30 par litre).

La question devait donc être reprise en entier. J'ai fait d'abord une expérience préliminaire, disposée comme suit :

On dissout dans 500 à 600 cc. d'eau 100 grammes de glucose, 5 grammes de phosphate bipotassique, 1 gramme de sulfate de magnésium, 2 grammes d'acide tartrique, en chauffant légèrement ; le liquide bien refroidi est additionné de 1 gramme d'urée, le volume complété à 1 litre. On filtre à la bougie et on reçoit dans un ballon d'environ 1.500 cc., puis on ensemence avec une petite quantité de levure pure (cette quantité n'a pas

ches qui vont être exposées ici dès le début de 1899. Je dois faire remarquer que, pendant l'exécution de ces expériences, NENCKI et ZALESKI ont publié une méthode de dosage de l'ammoniaque, basée sur le même principe et applicable à l'étude du sang et des tissus (*Zeits. physiol. Chemie*, t. 33, p. 193, 1901). L'appareil que j'ai employé a l'avantage d'une grande simplicité et permet d'utiliser le serpentin de SCHLESING-AUBIN qui existe dans tous les laboratoires.

•(1) A. MAYER, *Untersuchungen u. d. alkool. Gährung* (1869). Cité par DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. 3, p. 205.

(2) BEIJERINCK, *Centralbl. f. Bakter.*, t. 11, p. 68 (1892).

été déterminée, mais elle ne dépassait certainement pas 0 gr. 03 à l'état sec). Le ballon est placé à l'étuve à 25°.

Dans ces conditions, la fermentation est très lente et se poursuit pendant des semaines ; la quantité de levure paraît augmenter assez peu. Après 45 jours, le liquide a été examiné ; voici les chiffres trouvés :

	Avant fermentation	Après fermentation
Glucose	97 gr.	44 gr. 77
Alcool	»	38 cc.
Acide acétique	»	0 gr. 633
Urée	1 gr. 08	1 gr. 05 (1)
Azote total du liquide	0 gr. 504	0 gr. 500
Azote total de la levure	»	0 gr. 0066
Poids de levure formée	»	0 gr. 420

Il s'est donc formé peu de levure, dont la teneur en azote était de 5,48 p. 100 ; la consommation de l'urée n'a été que de 0 gr. 030, soit 1/36 de la quantité présente. J'ajoute qu'il ne s'était pas fait d'azote ammoniacal décelable dans le liquide fermenté. Néanmoins, la plus grande partie du sucre a été transformée en alcool.

Ce résultat, assez peu encourageant, correspond aux données anciennes. Mais il faut remarquer que, dans l'expérience précédente, l'épaisseur du liquide était considérable ; il paraît donc indiqué de recommencer en mettant le liquide en couche mince et en opérant dans des conditions d'aération qui puissent favoriser le développement de la levure végétal.

Une solution contenant 10 p. 100 de glucose, 0,25 p. 100 de phosphate bipotassique et 0,05 p. 100 de sulfate de magnésium est additionnée à froid d'une solution d'urée de manière à ce que la teneur du milieu en urée soit d'environ 1 gramme par litre. On stérilise la solution par filtration à la bougie et on l'introduit aseptiquement dans des ballons à fond plat, où le liquide occupe une épaisseur d'environ 2 à 3 centimètres, cha-

(1) Ces chiffres ont été déterminés gazométriquement à l'hypobromite par comparaison avec une solution d'urée titrée à 1 p. 1000. Les quantités sont rapportées au volume total de 1.000 cc.

que ballon contenant exactement 300 cc. de milieu. Le dispositif adopté est représenté (fig. 2) ; le liquide filtré est reçu dans un ballon répartiteur contenant 300 cc. entre les deux traits de jauge. Après avoir isolé ce ballon au moyen d'une pince placée sur le caoutchouc, on peut procéder commodément à la répartition. L'appareil tout entier est stérilisé d'une seule pièce à l'autoclave (1).

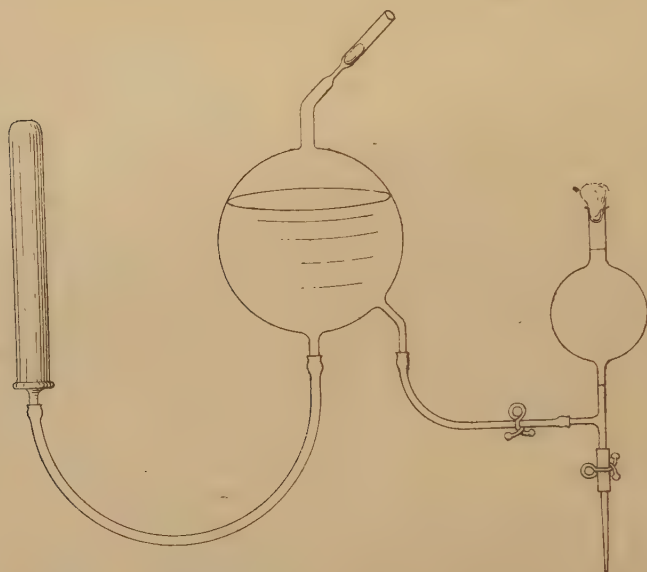


Fig. 2. — Dispositif de filtration et de répartition.

L'ensemencement est fait avec 10 cc. exactement mesurés d'une émulsion de levure pure dans l'eau stérile, rendue bien homogène par l'agitation (voir p. 21). Chaque ballon a reçu ainsi 10 cc. de liquide contenant 0 gr. 0382 de levure, séchée à 105°, et 4 mgr. 09 d'azote, sans trace d'ammoniaque.

Voici les chiffres obtenus avant et après fermentation, rapportés à la totalité du volume d'un ballon :

(1) La composition du liquide filtré n'étant pas la même au début et à la fin de la filtration, il est nécessaire de mélanger avant de répartir, pour éviter des erreurs dans les expériences comparatives.

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote total du liquide
	gr.	cc.	gr.	mgr.	—	mgr.
Témoin	29,64	»	0,0382	4,09 (1)	»	144,0
Après 14 jours .	20,00	5,0	0,2440	7,70	3,15	140,0
Après 19 jours .	13,67	8,3	0,3416	9,80	3,44	138,5

Aucun ballon ne renfermait d'azote ammoniacal.

La fermentation a été assez lente ; néanmoins la levure a emprunté à l'urée au moins 7 milligrammes d'azote, ce qui représente $\frac{1}{20}$ de la quantité présente.

La même expérience a été refaite, mais avec des ballons FERNBACH dont le fond possédait une surface telle que la couche de liquide (dont le volume restait le même, soit 300 cc.), n'avait pas plus de 1 centimètre d'épaisseur.

On a trouvé :

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote total du liquide
	gr.	cc.	gr.	mgr.	—	mgr.
Témoin	30,37	»	0,0382	4,09 (2)	»	147,0
Après 3 jours .	24,96	3,0	0,2586	10,50	4,06	140,5
Après 6 jours .	19,93	4,2	0,2800	11,20	4,00	140,0
Après 9 jours .	15,95	7,3	0,3260	13,50	4,14	136,5

Aucun ballon ne contenait trace d'ammoniaque.

On voit que la fermentation est plus rapide que dans l'expérience précédente : la consommation de sucre après 9 jours atteint presque cette fois la même valeur qu'après 19 jours dans la fermentation précédente. Le poids de levure obtenu représente à peu près 9 fois la quantitéensemencée ; la levure est un peu plus riche en azote et elle a emprunté à l'urée de 8 à 11 milligrammes d'azote, au minimum, allant ainsi jusqu'à $\frac{1}{13}$ de la quantité présente.

Il y a donc amélioration, mais les résultats sont encore bien imparfaits. Je me suis demandé si on n'obtiendrait pas une meilleure utilisation de l'urée en lui ajoutant un sel ammo-

(1) Cette quantité représente l'azote des 10 cc. d'émulsion introduits, mais non l'azote de la levureensemencée, qui n'était vraisemblablement pas supérieur à 2,5 milligrammes.

niacal, tartrate par exemple, dont la présence en stimulant la levure au début de la fermentation pourrait produire le résultat cherché.

Voici le dispositif adopté. La solution nutritive employée précédemment et contenant 1 gramme d'urée par litre est additionnée de tartrate neutre d'ammonium en quantité telle (0 gr. 219 par litre) que la teneur en azote ammoniacal soit de 10 milligrammes environ par ballon renfermant 300 cc. de liquide. On ajoute quelques gouttes d'une solution concentrée d'acide tartrique pour dissoudre le léger précipité formé, on filtre à la bougie et on répartit aseptiquement par portions de 300 cc. dans des ballons FERNBACH. L'ensemencement est pratiqué comme ci-dessus.

On obtient les résultats suivants :

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote ammonia- cal	Azote total du liquide
	gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.	mgr.
Témoin	27,78	»	0,0298	4,33	4,44	8,4	154,0
Après 5 jours .	12,14	5,0	0,1664	7,00	4,20	0,7	147,6
Après 10 jours .	9,02	12,5	0,2238	8,10	3,62	0,7	147,0
Après 20 jours.	traces	14,0	0,2580	8,75	3,40	traces	146,5

Un témoin, conservé le même temps à l'étuve (à 27°) a montré après 20 jours la même teneur en azote ammoniacal qu'au début, soit 8 mgr. 4. Il ne se fait donc aucune hydrolyse de l'urée dans le milieu abandonné à lui-même, pendant la durée et à la température de la culture.

La fermentation est manifestement accélérée par la présence de la petite quantité d'azote ammoniacal introduite. Comme on le sait déjà depuis DUCLAUX (1), cette forme d'azote est absorbée avec énergie par la levure, dès le début de la fermentation, et à partir du cinquième jour on n'en trouve déjà presque plus : cependant il en reste une faible quantité, semble-t-il, jusqu'à la fin. On peut noter que le rendement en levure n'est pas meilleur que dans les expériences précédentes ; ceci justifie en

(1) DUCLAUX, *Thèse*, Paris 1865.

quelque sorte l'opinion exprimée par DUCLAUX (1) au sujet de l'ammoniaque, qu'il considère comme défavorable à la levure végétal, mais favorable à la levure ferment.

Ce qui, à mon sens, ressort de plus important des chiffres qui viennent d'être cités, c'est que la levure paraît bien avoir déjà consommé de l'urée alors qu'il reste encore de l'ammoniaque non absorbée. Mais les quantités sont faibles et l'expérience a plutôt la valeur d'une indication que d'une démonstration.

Pour arriver à de meilleurs résultats, il fallait évidemment améliorer les conditions d'existence de la levure en modifiant le milieu nutritif. Je mentionne à titre de renseignement l'expérience suivante, dans laquelle le saccharose a été comparé au glucose, la préparation du milieu n'ayant subi aucune autre modification :

		Sucre présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote total du liquide
		gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.
Milieu	témoin	29,30	»	0,0165	4,0	6,0	146,5
à glucose	après 15 jours .	10,00	5,5	0,2009	7,2	3,6	140,0
Milieu à	témoin	34,00 (2)	»	0,0165	4,0	6,0	146,5
saccharose	après 15 jours .	46,76 (2)	3,7	0,0964	2,8	3,0	143,5

Le résultat est manifestement défavorable au saccharose. Il est à remarquer que HANSTEEN (3), nourrissant de jeunes plantes phanérogames (*Lemna minor* L., *Vicia faba* L., *Ricinus communis* L.), avec de l'urée, en présence, soit de glucose, soit de saccharose, a obtenu dans les deux cas une bonne assimilation de l'aliment azoté.

Je n'ai pas continué dans cette voie, mais j'ai songé alors à modifier la concentration en sucre. Des essais faits sur un plus petit volume de milieu, avec différentes teneurs en glucose, 5, 10, 15, 20 et 25 p. 100, m'ont prouvé que cette concentration

(1) DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. 3, p. 197 (1900).

(2) Calculé en saccharose. Il restait encore 4 gr. 46 de saccharose non interverti après 15 jours, ce qui indique une sucrase peu active.

(3) HANSTEEN, *Jahresber. f. wissenschaftl. Botanik*, t. 33, p. 417 (1899).

joue un rôle très important dans la rapidité du développement et la quantité de levure formée. Ainsi, on a obtenu, avec un ensemencement uniforme de 0 gr. 029 de levure, après 5 jours :

Glucose 0/0 :	5	10	15	20	25
Poids de levure . . .	0 gr. 135	0 gr. 160	0 gr. 366	0 gr. 452	0 gr. 418
Sucre restant, en 0/0					
de la quantité primitive	36	41	17	8	15

La teneur de 20 0/0 paraissant nettement la plus favorable, j'ai été conduit à modifier la composition du milieu nutritif, qui a été dès lors préparé de la manière indiquée plus haut (p. 20), c'est-à-dire en stérilisant par chauffage, dans les ballons, la solution glucosée avec les sels minéraux, et ajoutant après refroidissement complet la solution, stérilisée par filtration à la bougie, du corps azoté en expérience.

Il paraissait maintenant indiqué d'examiner l'action de doses variables d'urée. D'autre part, et pour avoir un point de repère, j'ai comparé l'action de ces doses à celle de quantités correspondantes d'ammoniaque. J'ai choisi comme sel ammoniacal le bicarbonate, en raison de ses rapports étroits avec l'urée. Ce sel présente l'avantage de ne pouvoir laisser dans le liquide par sa décomposition un acide capable de troubler les résultats en changeant la nature du milieu.

De plus, on peut tirer de cette expérience comparative une conclusion importante : si, comme il paraît probable d'après la discussion placée en tête de ce travail (voir p. 14), *l'assimilation de l'azote organique des amides revient en définitive à une formation préalable d'ammoniaque*, on doit trouver un parallélisme étroit entre la fermentation produite en présence d'urée et celle qui a lieu en présence du sel ammoniacal correspondant, le bicarbonate d'ammonium.

Dans trois ballons contenant chacun 300 cc. de solution minérale glucosée, on introduit respectivement 10 cc., 20 cc., 30 cc. de solution d'urée à 2 0/0, stérilisée à froid ; dans trois autres, 10 cc., 20 cc. et 30 cc. d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 4 0/0, également stérilisée à froid. Les six ballons

reçoivent chacun 10 cc. d'une émulsion de levure lavée à l'eau stérile, contenant 0 gr. 209 de levure séchée à 105°, avec 11 mgr. 2 d'azote, soit une teneur de 5,36 0/0. La fermentation dure environ 10 jours, au bout desquels l'expérience est interrompue. On trouve les chiffres suivants :

		glucose présent	alcool formé	Poids de levure séchée	azote de la levure	azote 0/0 de la levure	azote ammoniacal	azote total du liquide
		gr.	cc.	gr.	mgr.			mgr.
1. 10 cc. d'urée	av.	58,00	»	0,2090	11,2	5,36	»	78
	77 mgr. N } ap.	1,50	32,5	0,8154	41,3	5,06	»	47
2. 20 cc. d'urée	av.	58,00	»	0,2090	11,2	5,36	»	155
	154 mgr. N } ap.	1,40	30,7	0,8541	42,7	5,00	»	123
3. 30 cc. d'urée	av.	58,00	»	0,2090	11,2	5,36	»	232
	231 mgr. N } ap.	1,50	31,5	0,9080	43,0	4,96	»	197
4. 10cc CO ³ HNH ⁴	av.	58,00	»	0,2090	11,2	5,36	67	68
	67 mgr. N } ap.	1,46	35,0	0,8418	51,0	6,06	0	28
5. 20cc CO ³ HNH ⁴	av.	58,00	»	0,2090	11,2	5,36	134	135
	134 mgr. N } ap.	1,48	30,0	0,8402	58,1	6,91	17	88
6. 30cc CO ³ HNH ⁴	av.	58,00	»	0,2090	11,2	5,36	201	202
	201 mgr N } ap.	1,35	28,0	0,8749	59,5	6,80	80	154

Il est intéressant de constater que la presque totalité du sucre a disparu sans qu'il y ait de différence notable entre la série à urée et celle à bicarbonate d'ammonium. Peu de différence également dans les poids de levure obtenus, qui augmentent dans chaque série avec la richesse en azote, mais assez faiblement. Cette richesse en azote, qui croît dans le rapport de 1, 2 et 3, n'influe guère sur la teneur 0/0 d'azote de la levure. On voit que dès le second ballon de chaque série il y a un excès notable d'azote.

L'utilisation de l'urée est très bonne : la levure a gardé 30 milligrammes d'azote (sur 77 mgr. fournis) dans le premier ballon. Elle en a consommé bien davantage, si on songe à l'azote d'abord fixé puis éliminé dans le liquide comme pro-

duit d'excrétion, et qu'il n'est pas possible de connaître d'une manière exacte, mais dont la quantité est certainement importante. En effet, dans le ballon 4, les 67 mgr. d'azote ammoniacal fournis ont été assimilés en totalité, puisqu'il n'en reste pas ; or, la levure a seulement conservé 40 mgr. d'azote, en chiffres ronds. Dans le ballon 5, sur 117 mgr. d'azote ammoniacal utilisés, on ne retrouve que 47 mgr. dans la levure.

Bien entendu, les produits de l'activité cellulaire se retrouvent tous dans le liquide de culture ; non seulement leur isolement est impossible, mais on ne peut tenter dans un tel liquide un dosage précis de l'urée employée, sinon par des méthodes compliquées. L'intérêt de ce dosage est d'ailleurs bien relatif.

L'expérience a été refaite dans des conditions presque analogues à plusieurs reprises, avec des résultats très voisins. Voici les chiffres obtenus dans une expérience où la levure s'est montrée particulièrement active. Chaque ballon a reçu 0 gr. 197 de levure séchée à 105° contenant 12 mgr. 32 d'azote, soit 6,25 0/0. La fermentation a été arrêtée après 5 jours :

	glucose présent	alcool formé	poids de levure séchée	azote de la levure	azote 0/0 de la levure	azote total du liquide
	gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.
1. 10 cc. d'urée { av. 114 mgr. N } ap.	60,90 6,25	» 25	0,197 0,7949	12,32 51,10	6,25 6,42	114 75
2. 20 cc. d'urée { av. 228 mgr. N } ap.	60,90 7,50	» 23	0,197 0,7946	12,32 51,45	6,25 6,47	228 189
3. 30 cc. d'urée { av. 342 mgr. N } ap.	60,90 5,80	» 24	0,197 0,8023	12,32 51,80	6,25 6,45	342 302,5
4. 10cc CO ² HNH ⁴ { av. 87 mgr. N } ap.	60,90 11,60	» 25	0,197 0,7883	12,32 60,90	6,25 7,72	87 38,5
5. 20cc CO ² HNH ⁴ { av. 174 mgr. N } ap.	60,90 2,35	» 27,5	0,197 0,9902	12,32 82,25	6,25 8,28	174 104
6. 30cc CO ² HNH ⁴ { av. 261 mgr. N } ap.	60,90 1,65	» 29,5	0,197 1,4469	12,32 93,80	6,25 8,18	261 179,5

Ici, contrairement aux résultats de l'expérience précédente, la fermentation en présence du sel ammoniacal est en avance sur celle qui a lieu en présence d'urée. La contradiction n'est qu'apparente : en effet, la présence de l'ammoniaque a toujours pour résultat d'accélérer la disparition du sucre dans les débuts de la culture, celle-ci devenant ensuite plus paresseuse.

Quoiqu'il en soit, les expériences qui viennent d'être rapportées permettent d'appuyer les conclusions suivantes, que j'avais déjà formulées en 1901 (1) :

1° Lorsqu'on offre à la levure l'azote sous forme d'urée, dans un milieu minéral sucré, la fermentation est lente pour des teneurs en glucose voisines de 10 0/0 et la prolifération des cellules reste faible ; l'assimilation de cette forme d'azote est médiocre et la levure formée est pauvre en azote.

2° Si les conditions restent les mêmes on élève la proportion de sucre à 20 0/0, la fermentation devient très rapide, le poids de levure est plus grand, la quantité d'azote assimilé augmente beaucoup, la levure est plus riche en azote.

3° Si, toutes choses égales d'ailleurs, on introduit dans plusieurs ballons des quantités croissantes d'urée, on observe que la quantité de levure formée tend vers un maximum, ainsi que la quantité d'azote assimilé ; il en est de même, par conséquent, de la teneur centésimale de la levure en azote. Lorsque ce maximum est atteint, des quantités de plus en plus grandes d'urée n'ont plus aucune action.

4° Si on substitue à l'urée le sel ammoniacal correspondant, c'est-à-dire le bicarbonate d'ammonium, on voit que la concentration de 20 0/0 de sucre est également la plus favorable à la bonne assimilation de l'azote. En augmentant la dose de sel ammoniacal, on voit le poids de levure, la quantité d'azote fixée et la richesse de la levure en azote s'élever et tendre également vers un maximum, mais celui-ci est notablement plus élevé que pour l'urée.

La valeur de ce maximum dépend de la quantité de levure

(1) P. THOMAS, *C. R. Acad. Sciences*, t. 133, p. 312 (1901).

ensemencée, et de la nature de l'aliment azoté. Il y a vraisemblablement là un fait général : STERN a signalé en effet (1) un fait analogue en utilisant l'asparagine comme source d'azote.

J'ajouterai à ces conclusions la suivante :

Il y a un parallélisme remarquable entre les fermentations produites dans un milieu donné, avec une levure déterminée, lorsque l'azote est fourni, tantôt sous forme d'urée, tantôt sous forme du sel ammoniacal correspondant. *Il est donc extrêmement probable que l'assimilation de l'urée est précédée de sa transformation en ammoniacque.*

Les résultats obtenus sont susceptibles d'être critiqués en raison de ce qu'ils ont été déduits d'expériences faites avec une seule espèce de levure. Afin de pouvoir les généraliser avec certitude, je les ai comparés avec ceux que fournissent dans des conditions identiques des levures très différentes. J'ai choisi, à côté de la levure de vin ML, les levures suivantes provenant également de la collection du laboratoire de fermentations de l'Institut Pasteur :

	Désignation
une levure de bière basse	Boss
— — — haute	Bruxelles
— — de distillerie.	J

On a stérilisé par chauffage à l'autoclave huit ballons FERNBACH contenant chacun 300 cc. de la solution minérale glucosée à 20 0/0 qui a déjà été utilisée; quatre de ces ballons reçoivent en plus 10 cc. d'une solution d'urée à 2,4 0/0, préalablement stérilisée par filtration, et contenant 107 mgr. d'azote, les quatre autres recevant 10 cc. d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 6 0/0, également stérilisée par filtration et renfermant 105 mgr. d'azote.

Les quatre levures, rajeunies au préalable dans un milieu convenable (eau de touraillons sucrée), sont lavées rapidement et émulsionnées dans l'eau stérile; on sème un ballon à urée et un ballon à sel ammoniacal avec 10 cc. d'émulsion de chacune des levures. Ces émulsions ont été préparées de façon

(1) STERN, *J. of the chem. Society*, t 79, p. 941 (1904).

à avoir des quantités assez semblables de levure dans un même volume ; l'ensemencement est ainsi comparable (quoiqu'un peu supérieur pour la levure J).

On a laissé les cultures à l'étuve à 25° ; après trois jours, les fermentations ont été interrompues et on a obtenu les chiffres suivants :

		glucose présent	alcool formé	poids de levure séchée	azote de la levure	azote 0/0 de la levure	azote total du liquide
		gr.	cc	gr.	mgr.		mgr.
ML urée	av.	59,70	»	0,2320	20,3	8,75	108,0
	ap.	45,50	7,5	0,4382	22,7	5,20	105,6
ML CO ³ HNH ⁴	av.	59,70	»	0,2320	20,3	8,75	106,0
	ap.	40,25	10,0	0,5259	42,5	8,04	83,7
Boss urée	av.	59,70	»	0,2271	19,5	8,57	108,0
	ap.	54,75	2,5	0,3021	21,0	6,95	106,5
Boss CO ³ HNH ⁴	av.	59,70	»	0,2271	19,5	8,57	106,0
	ap.	54,50	2,0	0,3091	21,0	6,79	104,5
Bruxelles urée	av.	59,70	»	0,2740	25,0	9,11	108,0
	ap.	54,50	2,0	0,3315	26,0	7,83	107,0
Bruxelles CO ³ HNH ⁴	av.	59,70	»	0,2740	25,0	9,11	106,0
	ap.	54,50	2,0	0,3331	26,6	7,99	104,4
J urée	av.	59,70	»	0,3615	30,1	8,32	108,0
	ap.	34,50	14,0	0,6585	35,6	5,40	102,5
J CO ³ HNH ⁴	av.	59,70	»	0,3615	30,1	8,32	106,0
	ap.	30,75	17,0	0,6552	44,1	6,73	92,0

Tous les ballons contenaient un excès d'aliment azoté.

Les quatre levures conservent, comme on le voit, leur caractère propre dans les milieux artificiels où on les force à se développer : les deux levures de bière restent à développement un peu lent et font disparaître le sucre assez peu rapidement ; la levure de distillerie, au contraire, le consomme activement et prolifère beaucoup plus. Mais le caractère déjà indiqué, le parallélisme étroit entre les cultures à urée et à bicarbonate

d'ammonium, persiste d'une manière frappante. D'une façon générale, on voit aussi que dans les milieux évidemment un peu trop spéciaux qu'on lui donne, la levure de récente formation, développée dans les premiers jours de la culture, est beaucoup plus riche en azote que dans la période suivante. Elle doit donc être le siège de phénomènes autolytiques plus marqués que la levure qui se développe dans des milieux naturels.

Expériences avec les amides autres que l'urée

Il est intéressant d'étendre les résultats obtenus avec l'urée à d'autres amides susceptibles de servir d'aliments azotés à la levure.

En principe, la liste de ces corps peut être considérable ; cependant, il ne faut pas oublier que si les amides sont hydrolysés par la levure suivant l'équation :



ces corps ne pourront être utilisés qu'autant que la présence de l'acide $R - \text{COOH}$ correspondant ne viendra pas perturber les résultats.

D'autre part, il n'est pas toujours facile d'obtenir des amides pures, ne contenant pas de traces ou même de quantités notables de sels ammoniacaux, et il en est qui paraissent s'hydrolyser très rapidement dans leurs solutions aqueuses stériles. Autant de causes qui viennent restreindre la liste des corps susceptibles d'expérimentation.

*
* *

Je me suis d'abord adressé à l'acétamide, corps facile à obtenir et à purifier. D'autre part, l'acide acétique qu'il est capable de former par sa décomposition ne peut gêner la levure, qui en produit elle-même constamment aux doses employées.

Afin d'avoir un point de repère, j'ai comparé une culture faite en présence d'urée avec une culture faite en présence d'acétamide. Deux ballons contenant 300 cc. de solution minérale glucosée à 20 0/0 ont reçu, l'un 10 cc. de solution d'urée à 2,3 0/0, l'autre 10 cc. d'acétamide (purifiée par cristallisation dans le benzène bouillant) à 4 0/0; on aensemencé avec la même quantité d'une émulsion de levure et placé à l'étuve à 25°.

Au bout de 6 jours, la culture est interrompue et on procède aux analyses; on a les chiffres suivants :

		Glucose présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote total du liquide
		gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.
urée	av.	58,20	»	0,0620	4,25	6,85	110,0
	ap.	4,80	28	0,9742	49,68	5,10	64,0
acétamide	av.	58,20	»	0,0620	4,25	6,85	95,0
	ap.	50,50	3	0,2980	9,83	3,30	89,0

Si l'acétamide est utilisée, ce n'est qu'en petite quantité, et en donnant un rendement beaucoup plus faible que l'urée. Elle paraît donc beaucoup moins utilisable par la levure.

L'addition d'acétate d'ammonium à la culture semble stimuler beaucoup la fermentation et augmenter le rendement en levure. J'ai alors essayé des mélanges d'acétamide avec des quantités croissantes d'acétate d'ammonium et je les ai comparés avec des mélanges semblables d'urée et de carbonate d'ammonium.

Voici comment a été disposée l'expérience. Dans six ballons FERNBACH contenant le milieu minéral glucosé à 20 0/0, on ajoute une quantité de solution d'urée, stérilisée par filtration, telle que chaque ballon reçoive environ 100 mgr. d'azote sous cette forme (exactement 118 mgr. 8). On garde un ballon pour la comparaison et on ajoute respectivement aux cinq autres 5 cc., 10 cc., 15 cc., 20 cc. et 40 cc. de solution de bicarbonate d'ammonium stérile à environ 9 grammes par litre. Les six autres ballons ayant reçu chacun une quantité de solution stérile d'acétamide telle que leur teneur en azote soit de 135 mgr. 6, on en conserve un comme terme de comparaison

et on ajoute respectivement aux cinq autres 5 cc., 10 cc., 15 cc., 20 cc. et 40 cc. de solution stérile d'acétate d'ammonium à 11 grammes par litre. On ensemence avec une même quantité d'une émulsion de levure qui avait été rajeunie dans un milieu très nutritif et se montrait très active. Après 5 jours, on interrompt la fermentation et on analyse le contenu des ballons. On obtient les résultats suivants :

		glucose présent	alcool formé	poids de levure séchée	azote de la levure	azote 0/0 de la levure	azote ammoniacal	azote total du liquide
		gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.	mgr.
1. urée seule	{ av.	63,45	»	0,0334	3,08	9,21	»	123,80
	{ ap.	2,26	30,0	1,4678	71,82	4,89	»	55,06
2. urée + 5 cc. CO ³ HNH ⁴	{ av.	63,45	»	0,0334	3,08	9,21	9,60	133,40
	{ ap.	0,50	31,9	1,1782	73,50	6,24	0	62,98
3. urée + 10 cc. CO ³ HNH ⁴	{ av.	63,45	»	0,0334	3,08	9,21	19,20	143,00
	{ ap.	traces	32,0	1,1404	77,28	6,77	0	68,80
4. urée + 15 cc. CO ³ HNH ⁴	{ av.	63,45	»	0,0334	3,08	9,21	28,80	152,60
	{ ap.	0	32,0	1,0210	68,60	6,72	0	87,08
5. urée + 20 cc. CO ³ HNH ⁴	{ av.	63,45	»	0,0334	3,08	9,21	38,40	162,20
	{ ap.	0	32,4	1,0204	68,60	6,72	1,50	95,78
6. urée + 40 cc. CO ³ HNH ⁴	{ av.	63,45	»	0,0334	3,08	9,21	76,80	200,60
	{ ap.	0	32,0	0,9916	69,30	6,98	13,50	134,38
1. acétamide seule	{ av.	64,52	»	0,0334	3,08	9,21	»	140,60
	{ ap.	56,82	3,0	0,1641	3,85	2,34	»	139,83
2. acétamide + 5 cc. CH ³ CO ² NH ⁴	{ av.	64,52	»	0,0334	3,08	9,21	9,80	150,40
	{ ap.	42,37	10,2	0,3173	11,90	3,75	0	141,58
3. acétamide + 10 cc. CH ³ CO ² NH ⁴	{ av.	64,52	»	0,0334	3,08	9,21	19,60	160,20
	{ ap.	28,73	17,1	0,4875	18,90	3,87	0	144,38
4. acétamide + 15 cc. CH ³ CO ² NH ⁴	{ av.	64,52	»	0,0334	3,08	9,21	29,40	170,00
	{ ap.	17,24	24,0	0,7353	25,90	3,52	3,50	147,18
5. acétamide + 20 cc. CH ³ CO ² NH ⁴	{ av.	64,52	»	0,0334	3,08	9,21	39,20	179,80
	{ ap.	5,88	30,6	0,9339	33,36	3,57	11,70	149,52
6. acétamide + 40 cc. CH ³ CO ² NH ⁴	{ av.	64,52	»	0,0334	3,08	9,21	78,40	219,00
	{ ap.	traces	32,0	0,9049	53,90	5,98	35,00	168,18

Visiblement, l'addition de sel ammoniacal n'a pas tout à fait la même action avec les deux amides. La consommation du sucre est accélérée, mais les doses croissantes d'ammoniaque qui produisent une diminution légère, bien que manifeste, du rendement en levure dans le milieu à urée, donnent lieu au contraire à des récoltes de plus en plus abondantes dans le cas de l'acétamide.

Ce qu'il est important de constater, c'est l'utilisation de l'azote amidé en présence de l'azote ammoniacal. Tant que ce dernier est en quantité peu élevée, il est absorbé en totalité, mais là encore les résultats ne sont pas identiques avec les deux amides. Avec l'urée, on peut voir que même lorsque tout l'ammoniaque fourni à la levure est absorbé par elle, il y a encore utilisation d'une partie importante de l'urée du milieu; avec l'acétamide, au contraire, lorsque l'on fournit de l'acétate d'ammonium, la levure n'utilise guère que cette dernière forme d'azote, qui disparaît d'abord en totalité, au moins tant qu'elle représente une fraction de l'azote total n'excédant pas $\frac{1}{7}$ à $\frac{1}{8}$. Il faut aussi ne pas oublier qu'il s'agit de fermentations interrompues après un temps assez court; on est en droit de supposer qu'après une période d'accoutumance de quelques jours, la levure qui a d'abord consommé l'aliment azoté le plus facile à assimiler se serait rejetée sur l'acétamide et aurait peu à peu fait disparaître cette dernière.

La quantité d'azote trouvée dans la levure est plus petite que la quantité d'azote ammoniacal absorbée, parce que évidemment la levure a rejeté dans le liquide de culture un certain nombre de produits azotés provenant de ses échanges nutritifs. C'est seulement à partir d'une certaine dose de sel ammoniacal que la levure formée au début de la culture aux dépens de ce dernier a continué à se développer en utilisant une partie de l'acétamide présente. Le tableau suivant, calculé au moyen des résultats expérimentaux ci-dessus, montre bien cette utilisation ;

Nos des ballons	Urée			Acétamide		
	azote utilisé par la levure			azote utilisé par la levure		
	en totalité	provenant de CO^3HNH^4	provenant de l'urée	en totalité	provenant de $\text{CH}^3\text{CO}^2\text{NH}^4$	provenant de l'acétamide
	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.
1	68,74	»	68,74	0,77	»	0,77
2	70,42	9,60	60,82	8,82	9,80	?
3	74,20	19,20	55,00	45,82	18,60	?
4	65,52	28,80	36,72	22,82	25,90	?
5	65,52	36,90	28,62	30,28	27,50	2,78
6	66,22	63,30	2,92	50,82	43,40	7,42

(Les chiffres en caractères gras indiquent que la totalité de l'ammoniaque présent a été absorbé).

Il est évident que les chiffres indiquant la quantité d'azote utilisé provenant soit de l'urée, soit de l'acétamide, ne sont que des minima. Il n'est pas possible, en effet, de connaître directement ces quantités sans faire le dosage soit de l'urée, soit de l'acétamide présents dans les milieux de culture ; c'est là une opération qui, pour présenter quelque chance d'exactitude, est très pénible. Elle doit comporter, en effet, l'isolement intégral de ces substances, auxquelles se trouvent mélangés les produits azotés et non azotés de la vie cellulaire. En raison de l'altérabilité de certains de ces produits, il est évident que des dosages directs des amides, par transformation en ammoniaque, donneraient des résultats inexacts et vraisemblablement trop élevés. J'ai renoncé à un travail aussi pénible, en raison de l'intérêt limité que présenterait cette détermination.

On pourrait objecter, il est vrai, que à partir du moment où la levure renferme plus d'azote que la quantité d'azote ammoniacal disparu, l'excédent, au lieu d'être emprunté à l'amide, provient de l'utilisation des résidus azotés de la vie cellulaire, d'abord rejetés dans les premiers stades du développement, puis employés de nouveau, faute d'un meilleur aliment azoté.

Dans le cas de l'urée, l'objection tombe à cause de l'importance des quantités dont il s'agit : la levure n'a pu emprunter les $\frac{2}{3}$ ou la moitié de son azote à ses produits d'excrétion.

Avec l'acétamide, on pourrait opposer à cette objection l'argument suivant (qui est d'ailleurs valable aussi dans le cas de l'urée) : pourquoi la levure, qui est si avide d'ammoniaque, en laisserait-elle une partie inutilisée, si elle était réduite à s'adresser aux résidus de son activité ? Lorsque la levure en inanition emploie les déchets de la vie cellulaire pour reconstruire de nouvelles cellules, il est exceptionnel que sa quantité augmente ; *a fortiori* cette hypothèse est-elle inadmissible quand on voit l'accroissement considérable du poids de levure produit dans les mélanges d'acétamide et d'acétate d'ammonium (p. 42). Enfin, il est rare que le phénomène en question apparaisse dans des fermentations d'aussi courte durée que celles qui nous occupent (5 jours).

La conclusion à tirer de cette expérience, c'est plutôt que l'ammoniaque paraît nécessaire à la levure, même lorsque celle-ci peut disposer d'une autre source d'azote, au moins dans les premiers temps de son développement. En effet, en poursuivant une culture faite en présence d'acétamide avec un peu d'acétate d'ammonium pendant un temps suffisant, l'utilisation de l'amide augmente notablement.

En voici la preuve : deux ballons FERNBACH contenant 300 cc. de milieu minéral glucosé à 20 0/0 reçoivent une même quantité de solution d'acétamide et d'acétate d'ammonium, stérilisée par filtration à la bougie, correspondant à 97 mgr. d'azote amidé et 12 mgr. 6 d'azote ammoniacal. On ensemente avec une même quantité d'émulsion de levure pure dans l'eau stérile et on place à l'étuve à 26°. Voici les résultats obtenus :

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de la levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote ammoniacal	Azote total du liquide
	gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.	mgr.
Témoin . . .	56,50	»	0,4150	8,30	7,21	12,6	111,6
Après 5 jours .	47,35	3,5	0,3983	23,10	5,80	0	96,8
Après 10 jours .	28,42	14,3	0,6826	32,40	4,75	0	87,5

Ici, l'azote ammoniacal a entièrement disparu après 5 jours. Mais si à ce moment la quantité d'acétamide utilisée est faible

et correspond au minimum à 2 mgr. 2 d'azote, elle augmente nettement ensuite et après 10 jours correspond à 11 mgr. 5 d'azote au moins, c'est-à-dire plus de $\frac{1}{9}$ de la quantité présente.

Il n'en reste pas moins que l'acétamide ne peut être comparée à l'urée comme aliment azoté de la levure. Un fait qui semble indiquer aussi que la levure ne se trouve pas dans de bonnes conditions lorsqu'on lui fournit son azote sous forme d'acétamide, c'est la quantité élevée d'acides volatils qu'elle donne dans ces conditions. En étudiant la nature de ces acides volatils, qui devaient, me semblait-il, être formés à peu près uniquement d'acide acétique, j'ai constaté qu'en réalité il s'agissait d'un mélange d'acides formique et acétique. Je reviendrai plus loin sur ce fait, qui mérite d'être examiné de près.

*
* *

Afin d'étendre les résultats obtenus à d'autres amides, j'ai comparé à l'acétamide les corps les plus voisins de la même série, formiamide, propionamide, butyramide.

La formiamide du commerce se présente sous forme d'un liquide incolore, solution aqueuse concentrée du produit, qui est assez instable et contient toujours une certaine quantité d'ammoniaque. La purification en est presque impossible ; il m'a donc fallu l'utiliser telle. La propionamide et la butyramide ont été purifiées par cristallisation dans le chloroforme.

J'ai préparé des solutions aqueuses des quatre amides, telles qu'elles renferment environ 1 gramme d'azote pour 100 cc. et je les ai stérilisées par filtration. Quatre petits ballons FERNBACH contenant 100 cc. de milieu minéral glucosé à 20 0/0 ont reçu respectivement 10 cc. de chacune de ces solutions, avec toutes les précautions d'asepsie voulues. L'ensemencement a été fait comme d'ordinaire avec des quantités égales de levure. La fermentation a été interrompue après 10 jours ; on a trouvé :

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote amidé introduit
	gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.
Témoin	20,04	»	0,0861	5,25	6,10	»
Formiamide: . . .	0	9,6	0,2340	15,40	6,58	89
Acétamide	40,53	4,4	0,4407	6,25	5,68	103
Propionamide	11,69	4,0	0,1363	6,75	4,95	97
Butyramide. . . .	10,33	4,2	0,1334	6,50	4,87	95

Les rendements en levure sont faibles, ce qui est dû en partie sans doute à une aération insuffisante, la couche de liquide ayant au moins 2 centimètres d'épaisseur dans les ballons employés. Les résultats n'en sont pas moins comparables et permettent de conclure que la propionamide et la butyramide ne sont pas de meilleurs aliments azotés que l'acétamide. La formiamide semble posséder une action spéciale ; mais ne faut-il pas l'attribuer, soit à sa très facile décomposition en ammoniacque, soit à ce que le produit employé était déjà un mélange d'amide avec un peu d'ammoniacque, l'action excitatrice de cette dernière intervenant alors ?

Ce qu'il faut ajouter, c'est que dans les cultures obtenues avec ces diverses amides, il se fait de l'acide formique, comme en présence d'acétamide.

Recherche de la diastase hydrolysant les amides

Nous sommes maintenant en possession d'un certain nombre de faits à l'aide desquels nous pouvons essayer d'interpréter le phénomène de l'utilisation des amides par la levure.

La première hypothèse qui se présente à l'esprit est celle d'une simple hydratation destinée à fournir de l'ammoniacque. L'hydrolyse diastasique des amides, de l'urée en particulier, est un phénomène fréquent chez les végétaux : elle peut être provoquée par les cellules de nombreuses graines, entre autres celles des Papilionacées, comme l'a montré G. ZEMPLÉN (1) ; par

(1) G. ZEMPLÉN, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 79, p. 229 (1912).

des champignons inférieurs, tels que l'*Aspergillus niger*, d'après SHIBATA (1) ; enfin, par de nombreuses espèces bactériennes. Il suffit de rappeler que la fermentation ammoniacale de l'urée par le *Micrococcus ureæ* a été d'abord étudiée par VAN TIEGHEM (2) ; MIQUEL a isolé un grand nombre de microorganismes fermentant l'urée et montré que l'hydrolyse est due à la présence d'une diastase, l'uréase (3).

On pouvait donc supposer que la levure ne se comporte pas autrement et que, cultivée en présence d'urée, elle fournit aussi de l'uréase.

Pour vérifier cette hypothèse, je me suis servi de cultures faites en présence d'urée, qui ont été filtrées après des temps variables, additionnées d'une quantité d'urée correspondant à 2 0/0 environ, et filtrées ensuite à la bougie. Ces solutions, abandonnées pendant plusieurs heures à l'étuve à 50°, n'ont jamais montré une trace d'ammoniaque.

Comme les milieux de culture sont toujours un peu acides, et que l'uréase est très sensible à l'acidité, on peut craindre que la diastase ne soit détruite dans le liquide dans ces conditions. J'ai alors fait des cultures dans le milieu à urée, en présence de carbonate de calcium en léger excès, en agitant assez fréquemment, de manière à saturer les acides produits par la levure et à maintenir la neutralité. Le résultat a été le même.

Il faut donc en conclure que, si la levure sécrète de l'uréase, cette diastase ne diffuse pas dans le milieu. Ce résultat était d'ailleurs à prévoir, puisque les cultures faites en présence d'urée, même très âgées, contiennent toujours un excès d'urée et ne montrent pas la présence d'ammoniaque.

On pouvait espérer que la levure tuée par un antiseptique laisserait diffuser la diastase si celle-ci est présente dans les cellules. Afin de le vérifier, j'ai pris deux ballons FERNBACH contenant du milieu minéral glucosé et je les ai stérilisés par

(1) SHIBATA, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, t. 5, p. 384 (1904).

(2) VAN TIEGHEM, *Thèse*, Paris 1862.

(3) MIQUEL, *C. R. Acad. Sciences*, t. 111, p. 397 (1890) ; *Ann. de Micrographie*, t. 5, p. 371 (1893).

chauffage après avoir introduit dans l'un 5 grammes de carbonate de calcium et dans l'autre 0 gr. 30 d'acide tartrique (soit 0,1 0/0). Les deux ballons ont reçu après refroidissement la même quantité d'une solution d'urée stérilisée par filtration et ont été ensemencés, puis abandonnés à l'étuve. On agite chaque jour et on fait de temps à autre des prélèvements en prenant toutes les précautions d'asepsie nécessaires. A aucun moment le liquide ne donne de réaction positive au NESSLER. Au bout de 30 jours, on verse dans chaque ballon 1 cc. de solution alcoolique de thymol à 10 0/0; les ballons sont conservés à l'étuve à 25°, à l'obscurité, et on continue à effectuer des prélèvements de temps à autre. Le résultat est toujours négatif : c'est à peine si, après plusieurs semaines, le liquide prélevé donne après distillation une légère coloration jaune avec le réactif de NESSLER. Il n'y a donc pas eu de dédoublement de l'urée présente.

Ces essais ont été renouvelés avec diverses levures, de vin, de bière haute et basse, ensemencées dans des milieux à urée; on a essayé d'ajouter le thymol après des temps variables, sans jamais obtenir un seul résultat positif.

Il semble donc que la diastase cherchée, si elle existe dans la levure, ne diffuse pas dans le milieu. Il ne restait plus qu'à la chercher dans le suc cellulaire lui-même, en employant la méthode de BUCHNER-HABN.

Dans ce but, j'ai cherché à préparer une certaine quantité de levure développée sur un milieu à urée. M. A. FERNBACH a bien voulu mettre à ma disposition deux des appareils dans lesquels il prépare en grand les levures pures (1).

Un pied de cuve a d'abord été préparé dans des vases de cuivre étamés contenant chacun :

Saccharose.	800 gr.
Phosphate monopotassique . .	9 gr.
Sulfate de magnésium.	1 gr. 80
Eau	4 litres

(1) Décrit dans DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. 3, p. 726 (1900).

Après stérilisation à 120°, on refroidit et on ajoute 20 cc. de solution d'urée à 20 0/0 stérilisée par filtration, puis on commence. La fermentation se poursuit activement. Au bout de 5 jours, on introduit aseptiquement le contenu de chacun de ces vases dans deux cuves de FERNBACH renfermant chacune :

Saccharose	16.000 grammes
Phosphate monopotassique . .	180 »
Sulfate de magnésium	36 »
Urée	80 »
Eau	80 litres

L'urée avait été ajoutée après refroidissement, en solution aqueuse préalablement stérilisée par filtration. Le liquide a été aéré d'une manière continue.

La fermentation étant à peu près achevée au bout de 12 jours, la levure déposée a été soutirée après décantation du liquide surnageant. La quantité obtenue, rapidement égouttée sur une chausse, représentait environ 150 grammes de levure en pâte épaisse. On y ajoute un poids égal de levure fraîche de brasserie tamisée et lavée, on exprime fortement et on mélange la levure pulvérulente avec 200 grammes de sable quartzeux et 40 grammes de terre d'infusoires, selon la méthode indiquée par BUCHNER (1). On broie longuement dans un mortier et on exprime la masse pâteuse au moyen de la presse de BUCHNER.

On obtient, en élevant la pression jusqu'à 100 kgr., un volume de 45 cc. de liquide ; en allant jusqu'à 300 kgr., il s'écoule encore 25 cc. de suc, soit en tout 70 cc. Ce liquide a une réaction très légèrement acide au papier de tournesol.

On prépare deux portions de 5 cc. qui sont portées à l'ébullition et servent de témoins : le premier tube reçoit après refroidissement 5 cc. d'eau, le second 5 cc. de solution d'urée à 10 0/0. Dans deux autres tubes contenant chacun 5 cc. de suc de levure, on ajoute 5 cc. de solution d'urée à 10 0/0 ; l'un d'eux reçoit de plus 0 gr. 2 de carbonate de calcium précipité destiné à rendre la réaction parfaitement neutre au début de l'expérience. On

(1) E. BUCHNER, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 30, p. 117 (1897).

opère de même avec deux nouveaux tubes dans lesquels on ajoute une solution d'acétamide au lieu d'urée, le second recevant en plus 0 gr. 2 de carbonate de calcium.

Ces tubes sont laissés à la température ordinaire (17°). Une seconde expérience, disposée identiquement, est faite à l'étuve à la température de 30°. Enfin, le reste du liquide est additionné de 20 0/0 de saccharose en poudre, pour vérifier l'activité zymasique du suc. Ce dernier tube, laissé à la température ordinaire, donne seulement au bout d'une demi-heure un très faible dégagement de gaz, qui suffit pour prouver l'existence de la zymase.

Quant aux autres tubes, leur réaction n'a pas changé : elle est restée neutre ou très légèrement acide, pendant la durée de l'expérience, qui a été prolongée 13 heures. Il n'y a donc pas eu hydrolyse de l'urée. Les tubes additionnés d'acétamide ne donnaient pas non plus trace d'ammoniaque par chauffage avec la magnésie.

On peut conclure, semble-t-il, de cette expérience, que la levure employée ne contient pas d'uréase ni de ferment hydrolysant les amides et que ces diastases ne s'y développent pas par culture dans un milieu où l'azote est fourni sous forme d'urée.

Depuis j'ai eu à plusieurs reprises entre les mains des préparations de levures différentes, faites suivant la méthode de LEBEDEW (1) et susceptibles de fournir des macérations contenant une zymase très active : je n'ai jamais pu y déceler la présence d'uréase.

Discussion des résultats expérimentaux précédents

De toutes ces expériences résulte à l'évidence la conclusion que les amides employées, urée et acétamide en particulier, peuvent servir à la levure pour édifier son protoplasma vivant.

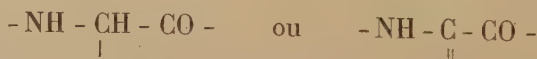
(1) LEBEDEW, *C. R. Acad. Sciences*, t. 152, p. 49 (1911).

Quel est le mécanisme de cette utilisation? S'agit-il d'un simple dédoublement hydrolytique avec formation de sel ammoniacal? Dans ce cas, il semble que nous devrions trouver, en regard de chaque amide employée, l'acide correspondant et lui seul; or, comme nous l'avons vu, il se fait toujours de l'acide formique en quantité notable, et nous aurons d'ailleurs à revenir sur ce point (1). Nous devrions également, dans cette hypothèse, déceler le ferment hydrolysant, en particulier l'uréase, ce qui n'est pas le cas.

Mais avant d'aller plus loin, il me faut examiner un travail très considérable, dû à H. PRINGSHEIM et paru cinq années après la publication de mes premiers résultats (2).

Ce travail comprend trois parties. Dans une première partie, l'auteur étudie les diverses sources d'azote convenables pour la levure et l'influence de leur constitution chimique sur le pouvoir ferment de cette dernière; dans la seconde, les substances qui agissent sur le pouvoir ferment, la multiplication et les échanges azotés de la levure; enfin, la troisième partie a trait à l'influence exercée sur la formation des produits secondaires.

Pour PRINGSHEIM, la levure peut bien bâtir son protoplasma avec diverses sources d'azote, mais elle ne peut faire fermenter le sucre que si on lui donne des substances azotées contenant le groupement :



Il définit sa proposition : « ce n'est pas une condition générale pour la formation de protéiques par la levure que la source d'azote contienne -NH - CH - CO - , mais seulement une condition pour que le plasma ait la capacité de faire la zymase ou de permettre l'activation de la zymase formée » (3). Cette hypothèse est née dans l'esprit de l'auteur à la suite des tra-

(1) Voir plus loin, p. 63.

(2) H. PRINGSHEIM, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 39, p. 4048 (1906); voir pour l'ensemble du travail, *Biochem. Zeitsch.*, t. 3, p. 121 (1907).

(3) H. PRINGSHEIM, *loc. cit.*, p. 125.

vaux de E. FISCHER, qui a montré l'importance particulière du groupement en question : c'est celui-ci, en effet, qui sert dans la molécule protéique à établir l'enchaînement des acides aminés.

PRINGSHEIM en trouve confirmation dans ses expériences : en effet, toutes les molécules contenant ce groupement fatidique lui donnent une levure douée de pouvoir ferment. Que se passe-t-il avec les molécules qui ne le renferment pas ? Dans ce cas, il y aurait d'après l'auteur une simple multiplication de la levure, en présence du sucre qui serait utilisé comme aliment carboné, mais sans subir la fermentation (1).

Un cas unique vient malheureusement renverser cette théorie : c'est celui de l'urée, dont j'ai montré en 1901 l'utilisation par la levure (2). Celle-ci se multiplie en sa présence et fait également fermenter le sucre. Pour se tirer d'affaire, PRINGSHEIM a cru devoir nier l'exactitude de mes résultats. Après avoir invoqué l'autorité de BEIJERINCK, d'après lequel l'urée est inutilisable pour la levure (3), il croit devoir expliquer mes résultats expérimentaux en supposant que par la stérilisation de mon milieu de culture l'urée a été transformée partiellement en ammoniacque. Il vérifie d'ailleurs qu'une solution d'urée stérilisée par la chaleur est alcaline et renferme de l'ammoniacque (4).

Je dois dire que je n'avais pas besoin, pour le savoir, de cette vérification expérimentale, et je m'en suis dispensé. Mais, si PRINGSHEIM avait lu attentivement ma note, il aurait vu que son objection n'a aucun sens, car j'y ai spécifié avec le plus grand soin que la solution d'urée, *stérilisée à part par filtration à la*

(1) PRINGSHEIM croit cette donnée tout à fait nouvelle ; c'est là une erreur. PASTEUR (*Etudes sur la bière*, p. 229 et suiv.) a en effet montré, comme nous l'avons rappelé plus haut (p. 19), que la levure se nourrit aux dépens du sucre sans agir comme ferment alcoolique d'une manière appréciable, pourvu qu'on opère en couche extrêmement mince.

(2) P. THOMAS. *C. R. Acad. Sciences*, t. 133, p. 342 (1901).

(3) BEIJERINCK, *Centralbl. f. Bakter.*, t. 11, p. 68 (1892).

(4) Par un oubli au moins singulier, PRINGSHEIM ne paraît pas avoir songé à la stérilisation par filtration à la bougie.

bougie, à froid, était ensuite ajoutée au milieu sucré, *stérilisé et refroidi*, et ce, pour éviter l'hydrolyse de l'urée. D'autre part, le témoin était toujours essayé afin de vérifier qu'il ne donnait pas de réaction ammoniacale.

Si mes expériences renversent la théorie de PRINGSHEIM, je n'y puis malheureusement rien. Il vaudrait mieux, je pense, accorder sa théorie avec les faits, que de poser *a priori* la théorie comme si certaine qu'elle pourrait être employée à rechercher la constitution chimique des corps azotés. De plus, il est surprenant de lire, sous la plume de PRINGSHEIM, que l'ammoniaque est par rapport à la levure dans une position particulière, en relation « avec une difficulté d'assimilation de la « levure, qui doit, d'après ses recherches, s'accoutumer à l'ammoniaque » (1). Ceux qui ont pu vérifier l'action des sels ammoniacaux sur la fermentation s'étonneront de cette constatation.

Quoiqu'il en soit, mon but dans les recherches faites avec l'urée et celui de PRINGSHEIM étaient différents : tandis qu'il cherche à donner à la levure le pouvoir ferment, j'essaie au contraire d'agir sur la multiplication du végétal, et ce n'est vraiment pas ma faute si en présence d'urée la levure a fait une zymase active.

Je dois également protester contre l'affirmation que l'acétamide ne donne qu'une faible production de levure sans fermentation visible, à moins d'être additionnée d'extrait de levure.

Dans la deuxième partie de son travail, PRINGSHEIM étudie l'influence de la nutrition azotée sur le degré de multiplication de la levure, son pouvoir ferment et les échanges azotés pendant la fermentation. Il rappelle d'abord les résultats énoncés par HAYDUCK (2) et qui peuvent se résumer ainsi :

1° La levure formée dans une solution contenant peu d'azote a une teneur en azote constante, la quantité qui se forme est proportionnelle à la teneur en azote de la solution ;

(1) PRINGSHEIM, *loc. cit.*, p. 132.

(2) HAYDUCK, *Zeits. f. Spiritus Industrie*, 1881, p. 173.

2° Si la solution a une teneur élevée en azote, la récolte de levure est constante, mais la teneur en azote augmente avec celle du liquide ;

3° L'azote contenu dans une solution est complètement assimilé par la levure seulement jusqu'à une certaine limite de concentration ; au-dessus de cette limite, il n'est plus employé à la production de levure ;

4° L'élimination d'azote par la levure augmente avec la teneur en azote du milieu, avec la durée de la fermentation et avec la température.

PRINGSHEIM ne paraît pas admettre que ces résultats puissent être discutés ; il ne faut pourtant pas oublier qu'ils ont été obtenus en utilisant l'asparagine comme aliment azoté, et qu'ils ne sont valables que pour cette source d'azote, au moins *a priori*. En effet, dans deux expériences comparatives, faites l'une avec urée et bicarbonate d'ammonium, l'autre avec acétamide et acétate d'ammonium (p. 42), on voit dans un cas la proportion de levure formée aller en diminuant, dans l'autre augmenter fortement ; dans les deux cas, les quantités d'azote sont presque égales et la richesse de la levure en azote augmente de la même manière. On n'a donc pas le droit de généraliser les conclusions de HAYDUCK.

Il en est de même de cette proposition énoncée par le même auteur : que le pouvoir ferment de la levure serait en rapport avec sa richesse centésimale en azote (1).

La valeur de ces résultats, qui ne tiennent nul compte de la richesse du milieu en sucre, apparaît clairement lorsque l'on fait varier cette richesse : en opérant avec la même source d'azote que HAYDUCK, c'est-à-dire l'asparagine, STERN était arrivé en même temps que moi — qui utilisais l'urée et l'acétamide —

(1) PRINGSHEIM me dénie le droit de critiquer les conclusions de HAYDUCK parce qu'elles ont été déduites d'expériences faites suivant un tout autre plan que les miennes. Mais il ne s'agit pas des résultats expérimentaux, dont personne ne songe à discuter l'exactitude ; il est seulement question des conclusions à en déduire, qui sont toujours justiciables de la critique lorsqu'on les généralise à l'excès.

à la conclusion suivante (voir p. 38) : l'augmentation de la quantité d'azote fourni à la levure n'augmente ni la quantité d'azote assimilé ni le poids de levure ; au contraire, si on élève la teneur en sucre, la quantité d'azote assimilé et le poids de levure formé augmentent.

PRINGSHEIM a cru devoir me reprocher — comme d'ailleurs à STERN — de ne pas tenir compte des matériaux azotés de désassimilation que la levure abandonne au liquide. Il m'attribue même l'opinion que la quantité d'azote trouvée par moi, dans la levure séchée à 105° jusqu'à poids constant, représente la quantité totale d'azote que la levure a emprunté au liquide (1). La réponse est aisée : il est bien difficile, sinon impossible, de tenir compte de substances dont la nature exacte est en partie encore inconnue et dont l'isolement ne peut être réalisé facilement, sauf dans un cas particulier : celui où l'azote est donné sous forme d'ammoniaque, dont le dosage est relativement facile. Dans ce cas, j'ai toujours indiqué évidemment la quantité d'ammoniaque réellement absorbée : elle est donnée par la différence entre l'azote ammoniacal au début et à la fin de la fermentation (p. 32, 33, 42, 44, 45).

Aussi comprend-on que tous les auteurs, comme STERN et comme moi-même, ont été obligés de se contenter du chiffre d'azote trouvé réellement dans la levure, en l'admettant comme valeur minimale de la quantité d'azote assimilé. La meilleure preuve que la difficulté ne peut être facilement résolue est donnée par PRINGSHEIM lui-même, car il n'opère pas autrement, excepté dans l'expérience suivante (2), qui est d'ailleurs à citer. Elle a pour but de montrer que l'utilisation de l'azote ammoniacal par la levure augmente quand la teneur en ammoniaque (sous forme de sulfate) s'accroît. La levure employée est une levure de vin.

(1) PRINGSHEIM, *loc. cit.*, p. 448. Je ne vois d'ailleurs pas très bien sur quoi ce reproche est fondé, car la note publiée par moi ne contenait que des conclusions générales, sans détails expérimentaux.

(2) PRINGSHEIM, *loc. cit.*, p. 498.

Voici les chiffres qu'il a obtenus :

Avant fermentation		A la fin de la fermentation					
quantité de sulfate d'ammo- nium	quantité d'azote correspon- dante	azote ammoniacal restant	azote ammoniacal utilisé	teneur en azote de la levure	teneur en azote de la solu- tion	azote abandonné au liquide	rapport de la teneur en N à N utilisé
gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	
3,026	0,6356	0,5978	0,0378	0,0067	0,6289	0,0311	4 : 5,6
1,513	0,3178	0,2268	0,0910	0,0479	0,2999	0,0731	5,1
0,757	0,1589	0,1092	0,0497	0,0419	0,1470	0,0378	4,2
0,378	0,0794	0,0380	0,0414	0,0109	0,0685	0,0305	3,8
0,189	0,0397	0,0074	0,0323	0,0096	0,0301	0,0227	3,4
0,095	0,0198	0,0	0,0198	0,0092	0,0106	0,0106	2,1

L'auteur a voulu montrer également, et il y arrive en effet, que la quantité d'azote ammoniacal utilisé dépasse de beaucoup la teneur de la levure en azote après fermentation.

Je suis arrivé à des résultats semblables, comme le montrent les chiffres des tableaux des pages 35, 44 et 45 (1), bien que les conditions de mes expériences soient différentes de celles de PRINGSHEIM ; il faut noter que cet auteur a opéré avec un ensemencement très faible, tandis que je suis toujours parti d'ensemencements massifs. Dans ce dernier cas, les quantités d'azote restituées au liquide sont encore plus considérables, mais on ne pourrait en tenir compte qu'en dosant les amides employées, urée, acétamide, etc. après fermentation. Comme je l'ai dit déjà, j'ai renoncé à un travail aussi pénible en raison du faible intérêt qu'il présente : peu importe en somme la grandeur exacte d'un rapport lorsque l'on connaît le sens de ce rapport.

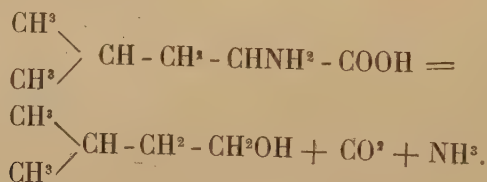
Depuis l'exécution des expériences que je viens de résumer et dont la plupart remontent à plusieurs années, WATERMAN a fait paraître un travail sur la nutrition azotée de la levure pres-

(1) Par exemple, p. 35, la levure ayant consommé respectivement 67 mgr., 117 mgr. et 121 mgr. d'azote ammoniacal n'en renferme à la fin de l'expérience que 40 mgr., 47 mgr. et 48 mgr. de plus qu'au début. Il est bien évident, pour qui sait lire les résultats indiqués, que la différence a été restituée au liquide sous forme de produits mal connus du métabolisme.

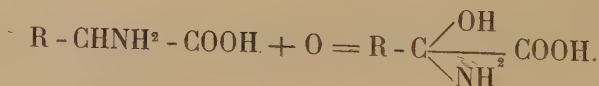
sée (1), où il compare les amines et les acides aminés, d'une part, avec les amides, d'autre part. Alors que le premier groupe ne renferme que de bons aliments azotés pour la levure, le second ne contiendrait, d'après lui, que la formi-amide, l'oxamide et la palmitinamide, comme substances permettant le développement de ce végétal. Ce travail paraît, à la seule lecture, bien sujet à caution.

Formation des protéiques de la levure

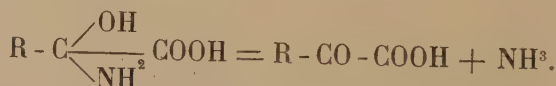
Les acides aminés sont facilement attaqués par la levure. On admet que cette dernière, en agissant sur eux, produit une désamination avec formation d'alcool contenant un chaînon carboné en moins. C'est ce que F. EHRLICH a montré dès 1905 (2) ; il a ainsi expliqué la formation d'alcool amylique aux dépens de la leucine :



Depuis, la réaction a été analysée, et grâce aux recherches de NEUBAUER et FROMHERZ (3) on sait qu'elle a lieu par les stades suivants :



L'hydrate d'acide iminé perd de l'ammoniaque et donne un acide cétonique :

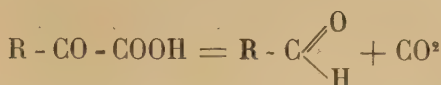


(1) WATERMAN, *Folia microbiologica*, t. 2, p. 173 (1913).

(2) F. EHRLICH, *Zeits. d. Ver. deut. Zuckerindustrie*, t. 55, p. 539 (1905).

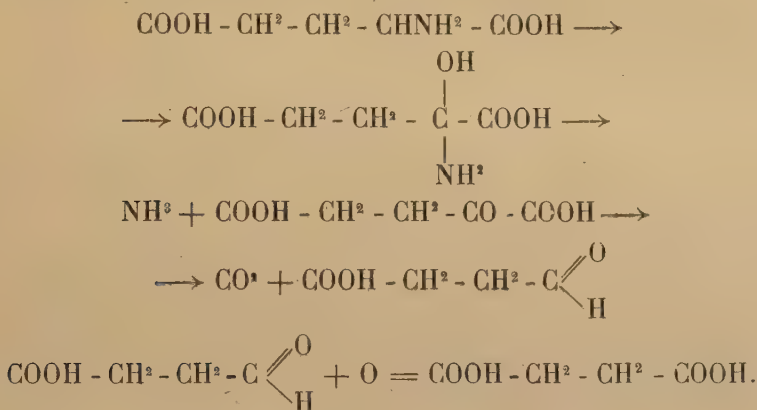
(3) NEUBAUER et FROMHERZ, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 70, p. 326 (1911).

Ce dernier subit la décomposition connue en aldéhyde et CO^2 :



et finalement l'aldéhyde est transformé en alcool par fixation de H^2 .

On peut aussi aboutir à une oxydation comme réaction ultérieure, si on admet que l'acide succinique présent dans les fermentations provient de l'acide glutamique par la suite des réactions suivantes :



Ce que nous devons retenir, c'est que la levure utilise l'ammoniaque mise en liberté pour faire sa propre substance protéique.

En est-il de même avec les amides? Il nous faut l'admettre puisque rien ne nous permet de supposer que celles-ci peuvent entrer soit entières, soit par fragments (groupe $\text{CO} - \text{NH}$, par exemple) dans les protéiques de la levure.

Je n'ai pu décèler la présence de la diastase, uréase ou acétamidase, qui devrait provoquer le départ de l'ammoniaque ; mais ceci peut tenir à l'imperfection des procédés de recherche, ou à une destruction de cette diastase aussitôt que son action s'est manifestée. D'autre part, l'étude des fermentations

faites en présence, soit d'une amide, soit du sel ammoniacal correspondant, montre une telle ressemblance, une telle similitude, qu'elle suffit à rendre la transformation extrêmement probable.

Le seul fait qui serait de nature à troubler cette conviction est la production d'acide formique qui accompagne les cultures faites en présence d'amides. Il pourrait faire penser à un mode de destruction des amides autre que l'hydrolyse pure et simple. Mais, comme nous le verrons plus loin, la production d'acide formique par la levure, dans les conditions spéciales que nous lui avons imposées, ne représente qu'un cas particulier, une exagération de cette production : toujours, peut-on dire, la levure produit de l'acide formique, même dans les milieux naturels (jus de raisin, etc.) qui contiennent des corps amidés. De plus, cet acide n'est vraisemblablement qu'un produit intermédiaire de la dislocation de la molécule de sucre, qui apparaît et persiste dans le liquide, parce que la levure a été en quelque sorte contrainte à modifier les conditions de son métabolisme habituel.

D'une manière générale, l'azote gagné par la levure correspond donc à celui perdu par les substances qu'elle a désaminées ou hydrolysées. Quant au carbone, il est emprunté au sucre : F. EHRLICH a montré en effet que si on donne à la levure un acide aminé, comme la leucine, avec peu de sucre, la culture est maigre, le dédoublement de leucine faible et en quelque sorte proportionnel au sucre présent (1). Ce qui tend encore à prouver que l'azote des acides aminés est simplement détaché sous forme d'ammoniaque, c'est que la présence dans le milieu de sels ammoniacaux à côté d'acides aminés protège ces derniers.

F. EHRLICH pense que la synthèse des protéiques ne se fait pas directement à partir du sucre, mais à partir d'un produit de décomposition de celui-ci. En effet, certaines levures (par exemple *Willia anomala* Hansen) se développent en présence

(1) F. EHRLICH, *Biochem. Zeitschr.*, t. 36, p. 477 (1911).

d'acides aminés (tyrosine) et de corps dérivés des sucres, alcool éthylique, glycérine, comme en présence du sucre lui-même : le poids de levure obtenu, la quantité d'azote assimilée, le rendement en tyrosol ou alcool p-oxyphényl-éthylique ont été sensiblement les mêmes qu'avec le saccharose. A remarquer que dans ces conditions les divers alcools sont oxydés en acides. EHRLICH a également essayé les alcools méthylique et amylique et l'acide lactique (sous forme de sel de calcium), mais les résultats sont moins bons, quoique la levure ait pu encore construire son protoplasma avec ces corps en présence de tyrosine comme source d'azote. Si on ajoute aux acides aminés l'acide pyruvique au lieu de sucre, les rendements sont bien meilleurs.

Le même résultat peut être obtenu également avec une levure de distillerie. F. EHRLICH en conclut que ces levures, en poussant dans des solutions où le sucre est remplacé par l'acide pyruvique, peuvent utiliser ce dernier corps à la fois comme source d'énergie et comme source de carbone pour la construction de leurs protéiques.

La synthèse des protéiques de la levure est évidemment de nature diastasique ; d'après KUTSCHER (1), cette synthèse est due au même ferment qui produit leur dégradation au cours de l'autolyse. Pour IWANOFF (2), l'action lytique est favorisée par le phosphate monopotassique, tandis qu'elle est arrêtée par le phosphate bipotassique. Ce dernier favorise au contraire l'action synthétique lorsque l'autolyse est arrivée à un degré convenable. Les processus synthétiques s'effectuent surtout aux dépens des peptones et polypeptides ; il y a donc au préalable une autre synthèse qui doit intervenir pour la formation de ces derniers composés : ceux-ci dériveraient alors de l'ammoniaque et des substances ternaires elles-mêmes dérivées des sucres.

(1) KUTSCHER, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 32, p. 59 (1901).

(2) IWANOFF, *Biochem. Zeitschr.*, t. 63, p. 359 (1914).

Quoiqu'il en soit, la levure, comme les végétaux verts, construit les matières azotées de son protoplasma à partir de l'ammoniaque et de produits ternaires en relation étroite avec les sucres. L'azote qui lui est fourni sous forme de combinaisons organiques est ramené à l'état d'ammoniaque avant toute utilisation.

CHAPITRE II

PRODUCTION D'ACIDE FORMIQUE PAR LA LEVURE EN PRÉSENCE DES AMIDES

Dans le compte-rendu des expériences précédentes, j'ai indiqué sans y insister, à propos des cultures de levure sur milieux à acétamide et amides voisines (voir p. 46 et 47) que l'acidité volatile formée est due en partie à la production d'acide formique.

Cette formation a déjà été signalée antérieurement. En 1891, RAYMAN et KRUIS (1) ont trouvé de l'acide formique dans des cultures de levure âgées de plusieurs années. Un peu plus tard, KHOUDABACHIAN (2) ayant trouvé ce même acide dans des moûts de raisins secs non fermentés, observa que sa proportion augmente pendant la fermentation et il attribua cette augmentation à de mauvaises conditions de nutrition de la levure.

D'après mes expériences, la levure cultivée en large surface dans un milieu minéral sucré peut fournir d'assez grandes quantités d'acide formique, si on lui donne l'azote sous certaines formes (3).

La présence de cet acide est facile à déceler dès que la fermentation est achevée et ne paraît pas liée à une alimentation défavorable. Ainsi, cultivée en présence d'urée (comme source d'azote) ou d'un mélange d'urée et de bicarbonate d'ammo-

(1) RAYMAN et KRUIS, *Chemisch-biologische Studien*, I (1891).

(2) KHOUDABACHIAN, *Ann. Institut Pasteur*, t. 6, p. 600 (1892).

(3) P. THOMAS, *C. R. Acad. Sciences*, t. 136, p. 1015 (1903).

nium, la levure se développe vigoureusement et produit une certaine quantité d'acides volatils, formés presque uniquement d'acide formique avec un peu d'acide acétique.

Les expériences dans lesquelles j'avais décelé, pour la première fois, la présence d'acide formique étaient peu favorables à l'étude de sa formation; en raison de la lenteur de la culture et du faible rendement en levure, on pouvait penser que cette formation était purement accidentelle et due à un état de souffrance de la levure. Aussi ai-je songé à rechercher systématiquement la nature des acides volatils formés en présence des diverses substances étudiées, et en particulier de l'urée, qui donne des cultures prospères.

Dans une expérience faite sur milieu glucosé à 20 0/0, on a obtenu les chiffres suivants :

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de levure séchée	Azote de la levure	Azote total du liquide	Acidité volatile
	gr.	cc.	gr.	mgr.	mgr.	mgr.
Témoin. . .	63,15	»	0,0334	3,08	123,80	»
Après 5 jours.	2,36	30,0	1,4678	71,82	55,06	555

Les acides volatils sont exprimés en acide acétique. La détermination de la nature des acides, faite par la méthode de DUCLAUX (1) a donné les résultats suivants (il n'a été fait que huit prises) :

Prises	Valeurs trouvées	Valeurs rapportées à 100	Valeurs des tables pour	
			l'acide formique	l'acide acétique
10 cc.	2,25	8,24	9,10	10,26
20	4,75	17,40	18,80	21,23
30	7,85	28,75	29,40	32,54
40	11,20	41,02	40,90	44,54
50	14,75	54,02	53,20	56,90
60	18,50	67,76	66,90	70,30
70	22,70	83,15	81,70	84,74
80	27,30	100,00	100,00	100,00

Il s'agit manifestement d'un mélange des acides formique et

(1) DUCLAUX, *Ann. Chimie et Physique*, 5^e sér., t. 2, p. 289 (1874).

acétique, avec approximativement 4 à 5 parties du premier pour une du second. Le liquide distillé, neutralisé, réduit d'ailleurs énergiquement le nitrate d'argent à chaud. La quantité d'acide formique produit est voisine de 0 gr. 150 pour 100 cc. de milieu, contenant 0 gr. 087 d'urée.

Dans l'expérience suivante, l'azote a été fourni sous forme d'un mélange d'urée et de tartrate d'ammonium. Pour augmenter la production des acides volatils, la fermentation est faite en présence de carbonate de calcium.

On prépare une solution minérale glucosée à 20 0/0, à laquelle on ajoute après refroidissement 0,10 0/0 d'urée et 0,07 0/0 de tartrate neutre d'ammonium. On stérilise par filtration et on répartit par fractions de 300 cc. dans quatre ballons FERNBACH renfermant chacun 5 grammes de carbonate de calcium précipité stérilisé. Les ballons étant ensemencés avec une égale quantité de levure sont placés à l'étuve à 25°. Voici les résultats obtenus :

	Glucose présent	Alcool formé	Poids de de levure séchée	Azote de la levure	Azote 0/0 de la levure	Azote ammo- niacal	Azote total du liquide	Acidité volatile
	gr.	cc.	gr.	mgr.		mgr.	mgr.	mgr.
Témoin	57,69	»	0,0351	2,28	6,49	30,2	170,0	»
Après 6 jours	15,45	22,0	0,4682	20,30	4,33	traces	151,2	600
» 8 »	4,31	27,5	0,5483	22,17	4,04	0	149,0	650
» 10 »	traces	29,1	0,5626	22,51	4,00	0	149,0	700

L'acidité volatile est exprimée en acide acétique. Voici les chiffres obtenus, rapportés à 100 :

cc.	6 jours	8 jours	10 jours	ac. formique	ac. acétique
10	5,40	5,66	6,75	5,9	7,4
20	11,92	12,15	13,27	12,2	15,2
30	18,90	19,63	20,70	19,0	23,4
40	27,47	27,95	28,80	26,4	32,0
50	36,60	37,02	37,13	34,4	40,9
60	45,84	46,71	45,90	43,2	50,5
70	56,13	57,26	55,35	52,8	60,9
80	67,75	69,19	66,97	64,6	71,9
90	81,46	82,86	81,10	79,6	84,4
100	100,00	100,00	100,00	100,0	100,0

THOMAS

5

Par conséquent, si on donne à la levure un mélange d'urée et d'un sel ammoniacal, l'acidité volatile augmente faiblement avec la durée de la fermentation.

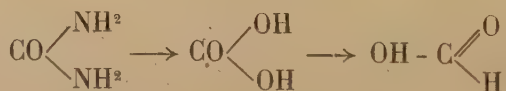
On voit qu'il s'agit de mélanges d'acide formique avec de l'acide acétique, ce dernier paraissant augmenter avec la durée de la fermentation plus que le premier, pour aboutir finalement à un mélange sensiblement à parties égales des deux acides.

La quantité d'acide formique obtenue serait donc, à la fin de l'expérience, d'environ 100 à 120 mgr. pour 100 cc. de liquide renfermant 100 mgr. d'urée et 70 mgr. de tartrate d'ammonium, c'est-à-dire sensiblement la même que dans l'expérience précédente.

Si on veut bien tenir compte du fait qu'une partie seulement de l'urée fournie est utilisée par la levure, on verra immédiatement que l'on ne peut songer à faire dériver directement l'acide formique de l'urée par une réaction qui comporterait, par exemple, une désamination et une réduction :



Dans le cas de l'urée, on aurait effectivement de l'acide formique :



mais alors 46 gr. d'acide formique proviendraient de 60 gr. d'urée, ce qui est impossible dans notre expérience. D'ailleurs, une telle réaction conduirait à la formation d'aldéhyde acétique avec l'acétamide, mais ne rendrait nullement compte de la production du même acide formique avec toutes les amides étudiées.

Cette hypothèse doit donc être rejetée d'ores et déjà.

Les expériences faites avec l'acétamide vont nous montrer avec encore plus d'évidence que l'origine de l'acide formique

ne doit pas être recherchée dans la décomposition de l'amide fournie comme aliment azoté. Cet acide ne peut donc provenir que du sucre, ou de réactions protoplasmiques de la levure.

Examinons ce qui se passe lorsque l'on donne à la levure de l'acétamide, en présence de doses variables d'acétate d'ammonium. Nous avons vu déjà (p. 43) que la consommation du sucre et le rendement en levure augmentent avec la teneur croissante en sel ammoniacal ; il en est de même de l'utilisation de l'acétamide. Rien d'étonnant à ce que la proportion d'acides volatils formés suive la même marche ; en effet, dans cette expérience, dont la durée a été de 5 jours, on a obtenu, au point de vue de l'acidité volatile, les résultats suivants :

	Sucre consommé	Alcool formé	Poids de levure formé	Azote fixé	Acidité volatile exprimée en	
					acide formique	acide acétique
	gr.	cc.	gr.	mgr.	mgr.	mgr.
1. Acétamide seule .	7,70	3,5	0,1307	0,77	202,4	264
2. Acétamide + 5 cc. CH ³ - CO ² NH ⁴ . .	22,15	11,0	0,2839	8,82	329,7	430
3. Acétamide + 10 cc. CH ³ - CO ² NH ⁴ . .	35,79	17,5	0,4541	15,82	440,8	575
4. Acétamide + 15 cc. CH ³ - CO ² NH ⁴ . .	47,28	25,0	0,7019	22,82	555,8	725
5. Acétamide + 20 cc. CH ³ - CO ² NH ⁴ . .	58,64	32,0	0,9005	30,28	766,7	1000
6. Acétamide + 40 cc. CH ³ - CO ² NH ⁴ . .	64,50	35,0	0,8685	50,80	595,0	776

Les chiffres expriment l'acidité en acide formique et en acide acétique ; il s'agissait, dans tous ces ballons, d'acide formique avec très peu d'acide acétique.

On peut voir que c'est seulement avec le poids de levure formée que la teneur en acide formique présente un certain parallélisme. Il est donc possible que ce corps résulte de l'activité protoplasmique, dirigée dans un sens particulier en présence des aliments azotés fournis, et qu'il s'en produit dès lors d'autant plus que la quantité de protoplasma augmente. D'autre part, il est également possible que l'acide formique représente un terme de passage qui ne persiste pas dans les conditions

habituelles d'existence du végétal ; la destruction de cet acide (ou sa transformation) se trouvant entravée par la présence des amides, on s'expliquerait pourquoi il apparaît et s'accumule dans le milieu.

En raison du remarquable rendement en acide formique présenté par les cultures faites sur acétamide, seule ou associée à l'acétate d'ammonium, j'ai essayé des mélanges d'acétamide avec divers sels ammoniacaux, afin de déterminer l'influence possible du radical acide.

		glucose présent	alcool formé	poids de levure séchée	azote de la levure	azote ammoniacal au début	acidité volatile (1)
		gr.	cc.	gr.	mgr.	mgr.	mgr.
Témoin		58,93	»	0,0494	4,8	»	»
1. Acétamide seule. . .		33,00	5,2	0,1110	5,9	»	375
2. — + bicarbonate		16,50	14,5	0,6658	33,6	39,9	534
3. — + sulfate .		19,30	8,7	0,6069	28,7	39,5	372
4. — + acétate .		18,54	11,0	0,5762	30,5	38,8	330
5. — + formiate		18,13	10,0	0,6269	35,0	38,1	479
6. — + butyrate		19,41	9,1	0,4860	29,4	38,5	345
7. — + oxalate .		17,74	10,0	0,8000	32,0	39,2	668
8. — + succinate		19,20	12,0	0,6115	33,1	37,5	520
9. — + lactate .		19,41	7,9	0,6442	36,0	39,9	290
10. — + tartrate.		17,94	8,5	0,6456	37,0	42,0	299
11. — + citrate .		18,75	11,0	0,5718	34,2	38,8	343
12. — + aspartate		2,46	23,1	1,0344	49,5	39,4	261

Les sels choisis ont été : bicarbonate, sulfate, acétate, formiate, butyrate, oxalate, succinate, lactate, tartrate, citrate et

(1) Exprimée en acide formique.

aspartate. On a pesé des quantités telles qu'un même volume de solution renferme à peu près la même quantité d'azote ammoniacal (environ 2 gr. par litre). Ces solutions ont été filtrées à la bougie; 20 cc., correspondant à 40 mgr. d'azote ammoniacal, ont été respectivement versés avec toutes les précautions nécessaires dans chacun des ballons contenant 300 cc. de milieu minéral glucosé. Chaque ballon a reçu également une solution d'acétamide stérilisée de manière à ce que la teneur en amide soit de 0,2 0/0; il y avait exactement, d'après le dosage, 132 mgr. d'azote amidé par ballon. Un ballon contenant seulement de l'acétamide a été réservé pour la comparaison.

L'ensemencement a été égal dans tous les ballons et le séjour à l'étuve à 26° a été de trois jours et demi. Déjà, après ce court espace de temps, l'azote ammoniacal avait notablement diminué dans tous les ballons qui en renfermaient.

Partout, les acides volatils consistent en un mélange où domine principalement l'acide formique, avec des quantités variables d'acide acétique. Le ballon 6, qui a reçu du butyrate d'ammonium, renferme de plus une proportion notable d'acide butyrique, qui n'est attaqué par la levure que très faiblement, ainsi que l'a constaté E. KAYSER (1).

Dans le cas de l'acétamide seule ou de son mélange avec le bicarbonate, le sulfate, l'oxalate, le succinate, il se fait presque uniquement de l'acide formique; au contraire, dans le cas où l'on a ajouté de l'aspartate, on a un mélange à peu près à parties égales des acides formique et acétique. Enfin, avec les lactate, tartrate et citrate, il semble que la formation d'acide acétique est un peu plus grande qu'avec le premier groupe de sels, mais sans atteindre au cas de l'aspartate.

Voici, par exemple, les chiffres obtenus par la méthode de DUCLAUX avec le bicarbonate, l'oxalate et le succinate, d'une part, avec l'aspartate, d'autre part (il n'a été fait que huit prises) :

(1) E. KAYSER, *Ann. Institut Pasteur*, t. 14, p. 619 (1900).

cc.	Bicarbonate	Oxalate	Succinate	Aspartate	ac. formique	ac. acétique
10	8,4	8,6	9,1	9,8	9,10	10,26
20	17,6	18,2	18,4	20,6	18,80	21,23
30	28,3	28,8	28,9	30,9	29,40	32,54
40	39,6	39,9	39,7	42,6	40,90	44,54
50	52,5	52,7	52,7	54,9	53,20	56,90
60	66,2	66,3	66,0	68,5	66,90	70,30
70	80,8	81,2	80,9	83,2	81,70	84,74
80	100,0	100,0	100,0	100,0	100,00	100,00

On peut remarquer *à priori* la faible teneur en acides volatils du milieu à aspartate et la teneur élevée au contraire (plus du double) du milieu à oxalate. D'une manière générale, les sels des trois acides bibasiques, oxalate, succinate et bicarbonate, donnent lieu à la plus grande production d'acide formique ; le formiate ne vient qu'après (nous pouvons constater en passant que l'acide formique du formiate introduit ne représente qu'un peu plus de 100 mgr., même pas le quart de la quantité trouvée).

Le radical acide paraît donc jouer un rôle dans la production de l'acide formique. Si, en général, pour un sel donné, la quantité de cet acide est en relation avec la quantité de levure formée, il n'en est plus de même d'un sel à un autre, puisqu'avec l'aspartate, qui donne le rendement le plus élevé en levure, on a la plus faible production d'acide. Il n'y a pas non plus de rapport invariable entre la formation de cet acide et l'activité de la levure, appréciée par la quantité de sucre consommée en un temps donné.

Les amides et les sels ammoniacaux existant normalement dans un certain nombre de milieux de culture naturels, tels que le jus de raisin, il ne serait pas surprenant de rencontrer de l'acide formique dans les vins aussitôt après la fermentation. Cet acide a été en effet trouvé normalement dans les vins par L. LIEBERMANN (1) et par KITICSAN (2) ; KHOUDABACHIAN a de nouveau signalé sa présence à l'état de traces (3). Lorsque les

(1) L. LIEBERMANN, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 15, p. 437 et 2553 (1882).

(2) KITICSAN, *Ibid.*, t. 16, p. 1179 (1883).

(3) KHOUDABACHIAN, *loc. cit.*

cultures deviennent plus âgées, la proportion d'acide diminue en général, parce que la levure le consomme lentement. Ce fait a été établi par E. DUCLAUX (1) ; la question a été reprise dans un travail méthodique par E. KAYSER (2) : cet auteur, ayant ajouté de l'acide formique à une culture de levure, a vu qu'après 135 jours une proportion de 83 0/0 de cet acide avait disparu.

Ce fait semble d'ailleurs devoir être généralisé pour la plupart des microbes producteurs d'acide formique : IWANOW a fait une constatation analogue pour la bactériodie charbonneuse (3) ; H. FRANZEN et ses collaborateurs l'ont signalé (4) avec *B. prodigiosus*, *B. plymouthensis*, *B. kiliensis*.

Plus récemment, H. FRANZEN et O. STEPPUHN ont publié, sur la production et la destruction d'acide formique par la levure (5), un intéressant mémoire qui doit nous arrêter un peu plus longuement en raison de la théorie proposée par les auteurs au sujet de l'origine de cet acide.

*
* *

On doit à WOHL (6) l'hypothèse d'après laquelle le glucose qui subit la fermentation alcoolique se transforme au préalable en une molécule de glyoxal et une molécule d'aldéhyde glycérique :

(1) DUCLAUX, *Ann. Institut Pasteur*, t. 6, p. 593 (1892).

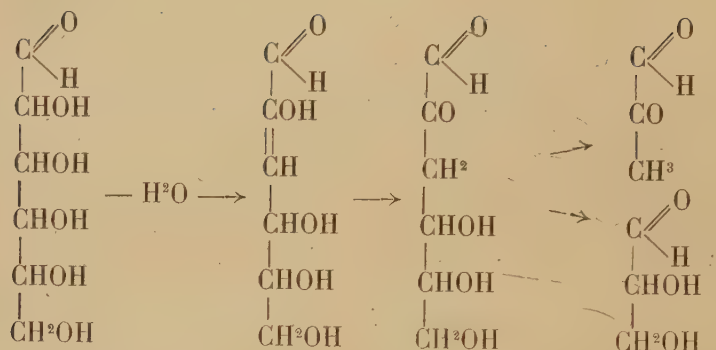
(2) E. KAYSER, *loc. cit.*

(3) IWANOW, *Ann. Institut Pasteur*, t. 6, p. 431 (1892).

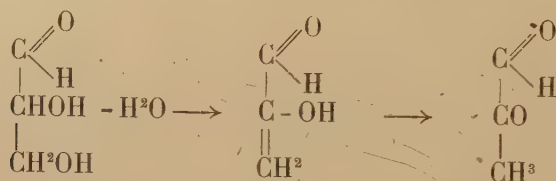
(4) H. FRANZEN et G. GREVE, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 64, p. 169 (1910) ; voir aussi : *Ibid.*, t. 67, p. 251 ; t. 79, p. 177 ; t. 83, p. 226 ; t. 88, p. 73 ; t. 90, p. 311.

(5) H. FRANZEN et O. STEPPUHN, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 77, p. 129 et t. 78, p. 164 (1912).

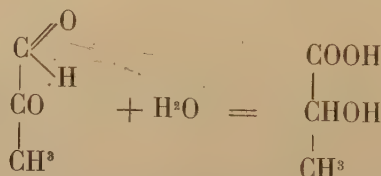
(6) WOHL, *Biochem. Zeits.*, t. 5, p. 45 (1907).



L'aldéhyde glycérique se transforme facilement en méthylglyoxal :

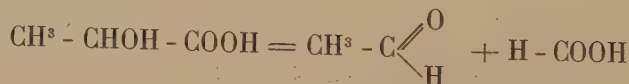


Finalement, le méthylglyoxal se transformerait en acide lactique :



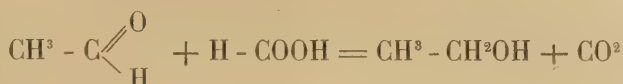
et ce dernier donnerait ultérieurement de l'alcool et de l'anhydride carbonique.

SCHADE a complété cette théorie (1) en admettant que le passage de l'acide lactique à l'alcool se ferait en deux phases. Dans une première, cet acide se dédoublerait en aldéhyde éthylique et acide formique :



(1) SCHADE, *Zetts. f. physikal. Chemie*, t 57, p. 4 ; *Biochem. Zeits.*, t. 7, p. 299 (1907).

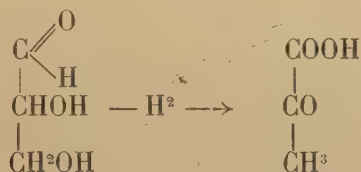
Dans une seconde phase, l'aldéhyde serait réduit en alcool par l'acide formique et l'on aurait :



En fait, SCHADE a réussi à produire cette seconde phase en dehors de toute action de la levure, en se servant du rhodium comme catalyseur.

On peut objecter d'abord à la théorie de SCHADE que, d'après BUCHNER et MEISENHEIMER (1), non seulement l'acide lactique ne se trouve jamais dans les produits de la fermentation alcoolique, mais encore il n'est pas dédoublé par la levure.

D'ailleurs, on sait maintenant que l'aldéhyde glycérique peut se transformer par perte d'hydrogène en acide pyruvique :



et que ce corps est lui-même dédoublé par la carboxylase en aldéhyde éthylique et gaz carbonique (2). Or, l'acide pyruvique est réellement présent dans les produits de la fermentation alcoolique, où il peut apparaître en quantité assez considérable, aux dépens du sucre fourni, comme l'ont montré A. FERNBACH et M. SCHÖEN (3), et il est devenu en quelque sorte le pivot de toutes les théories récentes de la fermentation alcoolique : LEBEDEV et GRIAZNOW (4) le prennent comme intermédiaire entre l'aldéhyde glycérique et l'acétaldéhyde devant conduire à

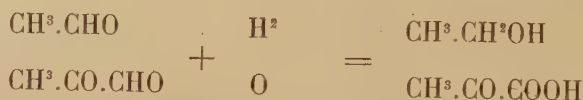
(1) BUCHNER et MEISENHEIMER, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 43, p. 1773 (1910).

(2) C. NEUBERG et HILDESHEIMER, *Biochem. Zeits.*, t. 31, p. 170 (1911).

(3) A. FERNBACH et M. SCHÖEN, *C. R. Acad. Sciences*, t. 157, p. 1478 (1913) et t. 158, p. 1719 (1914).

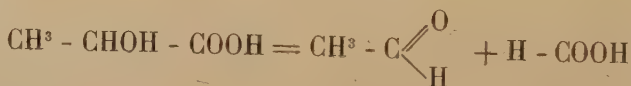
(4) LEBEDEV et GRIAZNOW, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 45, p. 3236 (1912).

l'alcool; C. NEUBERG et KERB (1) admettent sa formation en même temps que celle de glycérine aux dépens du méthylglyoxal, et sa transformation en aldéhyde qui réagit sur le méthylglyoxal pour conduire à l'alcool et à une nouvelle formation d'acide pyruvique, par une sorte de réaction de CANNIZZARO :



Dans ces nouvelles théories, il n'y a plus de place pour l'acide formique : NEUBERG et KERB ont montré en effet (2) qu'en mettant en présence de la levure un mélange des acides pyruvique et formique, il ne se produit pas d'alcool. D'autre part, les mêmes auteurs ont montré (3) que la fermentation de l'acide pyruvique ne donne pas lieu à la moindre formation d'acide lactique, qui en dériverait pourtant si facilement par réduction.

La théorie de SCHADE est-elle donc à supprimer définitivement ? Il semble bien que non si on se reporte au travail de MAZÉ (4) sur la fermentation alcoolique de l'acide lactique. Il ne s'agit plus de la levure, mais d'un bacille qui consomme l'acide lactique et donne justement le dédoublement indiqué par SCHADE :



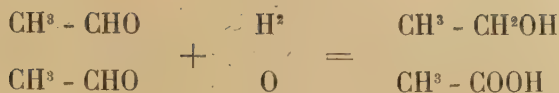
Mais on ne trouve guère, à côté de l'acide formique, que de l'alcool et de l'acide acétique, soit que l'aldéhyde se réduise sous l'action de l'acide formique pour donner l'alcool, en même temps qu'il subit l'oxydation qui le transforme en acide acétique, soit qu'il subisse la réaction de CANNIZZARO :

(1) NEUBERG et KERB, *Biochem. Zeits.*, t. 58, p. 458 (1914). Pour plus de détails, voir l'excellente revue de G. ABT sur l'acide pyruvique, dans *Bull. Soc. Chimie Biologique*, t. 1, p. 37 (1914).

(2) NEUBERG et KERB, *Zeits. f. Gährungsphysiol.*, t. 1, p. 114 (1912).

(3) NEUBERG et KERB, *Biochem. Zeits.*, t. 62, p. 489 (1914).

(4) MAZÉ, *C. R. Acad. Sciences*, t. 156, p. 1101 (1913).



La question de l'origine de l'acide formique produit par la levure conserve donc un assez grand intérêt.

H. FRANZEN et O. STEPPUHN, dans le travail cité plus haut, supposent que cet acide provient du dédoublement du sucre. Ils constatent, avec diverses levures (*Saccharomyces cerevisiæ* I, *S. ellipsoïdeus* I et II, *S. pastorianus* I, II et III, *S. logos*, *S. niger*, etc., venant de KRAL), que dans un milieu formé de mout de bière, additionné ou non de formiate de sodium, il y a en général production d'acide formique et cela dès les premières 24 heures (1). Puis cet acide disparaît assez lentement. Cependant certaines espèces, comme *S. niger*, qui font de l'acide formique, ne le font pas disparaître ultérieurement.

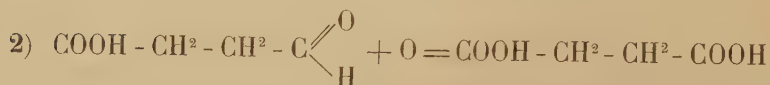
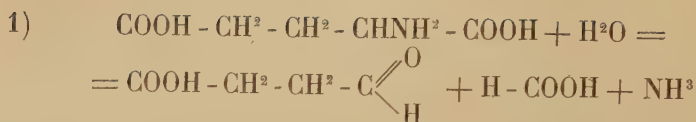
Les auteurs vérifient d'abord que l'acide formique trouvé dès le début de leurs expériences ne préexistait pas dans le mout de bière : ce milieu en renferme en effet (0,0467 par litre pour le milieu des auteurs) mais une proportion bien inférieure aux quantités trouvées.

Quelle est donc l'origine de cet acide ?

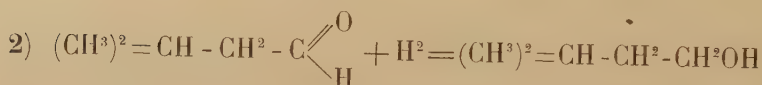
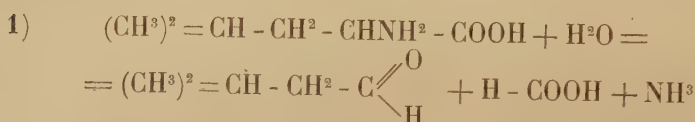
On pourrait supposer qu'il provient d'une décomposition de l'acide glutamique, qui donnerait en même temps l'acide succinique :

(1) En citant la note préliminaire que j'ai publiée sur ce sujet en 1903 (*C. R. Acad. Sciences*, t. 136, p. 1015), ces auteurs ont commis une erreur assez considérable : ils pensent en effet (*loc. cit.*, p. 153) que « une quantité « d'acide formique aussi grande que celle que j'ai pu obtenir doit être rap- « portée à la fermentation des acides aminés, d'autant plus qu'il s'en « forme une quantité particulièrement grande en présence d'acétamide et « d'aspartate d'ammonium ». Or, j'ai dit justement que c'est dans ce dernier cas que l'on obtient le plus d'acide acétique et le moins d'acide formique. Il suffira de se reporter aux chiffres de la page 70 pour se rendre compte du fait.

D'autre part, dans le travail en question de FRANZEN et STEPPUHN, une faute d'impression leur fait dire à plusieurs reprises que j'ai employé comme source d'azote l'*urine*, alors qu'il s'agit d'*urée*.



ou de la transformation de la leucine en alcool amylique par les réactions :



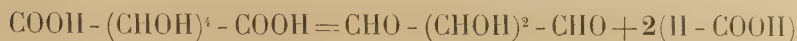
mais alors la quantité d'acide formique trouvée serait en rapport avec celles d'acide succinique ou d'alcool amylique présentes ; or, il est facile de calculer que la quantité qui pourrait se former ainsi est 4 à 8 fois plus petite que les quantités trouvées.

Comme d'ailleurs il est bien admis depuis le travail de NEUBAUER et FROMHERZ (1) que la transformation des acides aminés se fait par l'intermédiaire des acides α -cétoniques et ne comporte pas de formation d'acide formique, il faut renoncer à cette explication.

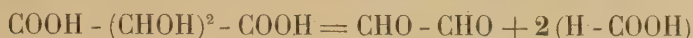
Une autre hypothèse est la suivante : pour faire avec les sucres et les aliments azotés la substance de son propre corps, la levure a besoin d'une certaine quantité d'énergie, comme d'ailleurs les plantes supérieures. Dans le but de se procurer cette énergie, nous voyons celles-ci oxyder partiellement les sucres pour donner des acides organiques (acide oxalique principalement). On peut se représenter, par exemple, cette oxydation de la manière suivante : si elle porte sur les deux bouts de la chaîne du glucose, on a de l'acide saccharique,

(1) NEUBAUER et FROMHERZ, *loc. cit.*

qui, par perte de deux molécules d'acide formique, donne :

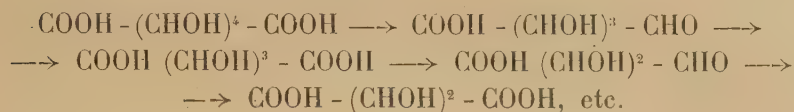


Le dialdéhyde correspondant à l'acide tartrique, ainsi formé, s'oxyde en donnant l'acide tartrique, et celui-ci se décompose :



Finalement le glyoxal formé donnerait de l'acide oxalique.

Il pourrait d'ailleurs ne se détacher qu'une seule molécule d'acide formique et on aurait :



Cette hypothèse, valable pour les végétaux verts, ne l'est pas pour la levure. En effet, d'une part, la fermentation se produit dans des conditions d'anaérobiose, sans que l'oxygène intervienne ; d'autre part, la levure ne produit pas d'acides organiques comparables à ceux des végétaux verts. L'acide oxalique en particulier n'a jamais été décelé dans les produits de la fermentation. D'ailleurs, il suffit de remarquer que la levure n'a nul besoin de cette source d'énergie, car elle en trouve une suffisante quantité dans la décomposition du sucre en alcool et gaz carbonique. Il ne reste donc comme hypothèse possible que d'admettre une formation d'acide formique au cours de cette dernière décomposition.

On peut remarquer que le stade de formation de l'acide formique coïncide avec celui du bourgeonnement énergétique de la levure, avec la présence de cellules jeunes et très actives, tandis que le stade de fermentation de cet acide correspond à un développement lent. Mais comme il y a sans cesse formation d'acide par les jeunes cellules qui se développent et en même temps consommation de cet acide par celles qui sont arrivées au terme de leur développement, il en résulte que les chiffres trouvés à un moment quelconque ne sont que la différence entre l'acide formique produit et consommé.

La présence de quantités assez notables d'acide formique (introduit sous forme de formiate de sodium) ne gêne pas la production d'alcool ni les processus de la fermentation ; la levure peut elle-même produire cet acide en quantité appréciable, elle peut le faire fermenter. Il apparaît donc de plus en plus probable que sa formation et sa disparition sont en rapport avec la décomposition du sucre en alcool et gaz carbonique.

Dans ces conditions, il est probable qu'il s'agit d'un processus diastasique. Si on mélange du suc de levure, préparé par la méthode de BUCHNER-HAHN, avec une solution de formiate de sodium, ce sel ne disparaît pas (1) ; au contraire, il est assez rapidement fermenté si on ajoute 10 0/0 de saccharose. La fermentation de l'acide formique est donc en rapport étroit avec celle du sucre.

Que devons-nous conclure de tous ces faits ? L'impression qui s'en dégage est que la levure est un organisme d'une très grande plasticité, qui n'agit pas suivant un plan invariable et rigide, ni par un mécanisme unique. Parmi tant d'explications proposées pour le phénomène de la fermentation, ce n'est sans doute pas une seule qu'il faut choisir à l'exclusion de toutes les autres, mais plusieurs, qui fonctionnent suivant les circonstances et peuvent se remplacer ou même se superposer quand les conditions d'existence varient.

(1) On sait que la levure est capable de produire la fermentation de l'acide formique, avec dégagement de gaz carbonique, en l'absence de sucre (NEUBERG et TIR, *Biochem. Zeits.*, t. 32, p. 323, 1941).

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

CHAPITRE PREMIER

PRÉPARATION DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Il n'est pas facile, comme nous l'avons vu, de préciser dans tous ses détails le mode de synthèse des protéiques chez les plantes hétérotrophes et en particulier chez la levure. Mais, au moins, avons-nous sur ces protéiques des indications complètes? Connaissons-nous, à défaut de leur origine, leur nature, leur constitution, leurs propriétés? En examinant la littérature scientifique, nous allons voir qu'il n'en est rien; c'est pourquoi j'ai cru utile d'attaquer également la question par cette face.

Les premiers essais systématiques d'extraction des protéiques de la levure remontent à l'année 1844; c'est SCHLOSSBERGER (1) qui le premier en a extrait par l'action de la potasse étendue, suivie de filtration et de précipitation par l'acide sulfurique, un corps contenant de 13,75 à 14 0/0 d'azote et possédant quelques-unes des réactions colorées des protéiques. NÆGELI et LÖEW, dans leurs recherches sur la composition chi-

(1) SCHLOSSBERGER, *Liebig's Ann. d. Chemie u. Pharmazie*, t. 51, p. 193 (1844).

mique de la levure (1) extraient, soit par macération, soit par ébullition avec l'eau, des corps mal définis, paraissant appartenir au groupe des protéines simples.

Jusque-là, la teneur de la levure en protéiques est loin d'être fixée. Ainsi PAYEN (2) indique une teneur en matière azotée de 62,73 0/0, tandis que NÆGELI et LÖEW donnent 45 0/0 de protéiques avec 2 0/0 de peptones et 4 0/0 de matières extractives (azotées?). D'après STUTZER (3), sur une teneur de 7,776 0/0 en azote de la levure, 5,519 0/0 appartiennent aux protéines et 2,257 0/0 aux nucléines, soit un rapport de 5/7 à 2/7 environ. D'autre part, il y aurait 63,80 0/0 d'albumines et 36,10 0/0 de nucléines.

BOKORNY (4), sans chercher à extraire les matières protéiques elles-mêmes, fixe la quantité d'albumine que renferme la levure à 3,50 — 5,90 0/0.

En somme, aucun des précédents auteurs n'a eu entre les mains de produits correspondant vraiment à ceux qui forment le protoplasma de la levure. Il fallait la méthode de BUCHNER pour arriver à extraire le contenu cellulaire et expérimenter avec lui. E. BUCHNER signale déjà un fait précis : c'est que le suc de presse qu'il obtient renferme « des albumines coagulables comme celles des organes des animaux » (5). Mais c'est WROBLEWSKI (6) qui extrait le premier du suc de levure de BUCHNER des protéines. Il procède par coagulations successives et obtient des corps coagulant à 41°, 51°, 56°, 59°, 62° et 68° ; il montre que ces corps précipitent par saturation partielle ou totale avec le sulfate d'ammonium ou par addition d'alcool.

Quelques années plus tard, R. SCHROEDER (7) réussit, par une

(1) NÆGELI et LÖEW, *J. f. prakt. Chemie*, t. 17, p. 403 (1878), et aussi *Liebig's Ann.*, t. 193, p. 322.

(2) PAYEN, *Mémoires présentés par divers savants étrangers*, t. 9, p. 32.

(3) STUTZER, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 6, p. 572 (1882).

(4) BOKORNY, *Zeits. f. Spiritus industrie*, t. 18, p. 33 (1900).

(5) E. BUCHNER, H. BUCHNER et M. HAHN, *Die Zymasegährung*, München et Berlin, 1903, p. 73.

(6) WROBLEWSKI, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 31, p. 3218 (1898).

(7) R. SCHROEDER, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, t. 2, p. 389 (1902).

méthode différente, à préparer des protéiques coagulables en partant de la levure. Il mélange la levure pressée avec de l'éther, qui détermine une plasmolyse énergique. La masse se liquéfie, et abandonne alors à l'eau une substance que l'on peut en séparer en la coagulant par chauffage à l'ébullition. Ce produit, lavé et séché, renferme C = 52,38 ; H = 6,91 ; N = 15,80 à 15,92 ; S = 0,72 ; P = 0,06 ; cendres = 0,14. Il possède la plupart des réactions des protéiques (1).

Enfin, SEDLMAYR (2) aurait pu obtenir une albumine coagulable en traitant par une solution de carbonate d'ammonium de la levure tuée par l'alcool.

Je ne dois pas oublier de mentionner que bien avant ces recherches A. KOSSEL (3) avait réussi à extraire de la levure d'autres produits définis, appartenant au groupe des nucléïnes ; mais il s'agit évidemment ici de produits dus à l'action des réactifs et non préexistants dans la cellule. KOSSEL traite la levure lavée par de la soude très diluée, filtre et recueille le liquide filtré dans l'acide chlorhydrique étendu. Il obtient un précipité qui après lavage présente la composition : C = 40,81 ; H = 5,38 ; N = 15,98 ; P = 6,19 ; S = 0,38. Dans des préparations ultérieures, il trouve pour le phosphore les valeurs : 3,28 ; 3,55 ; 3,94 et ne réussit pas à obtenir un corps aussi riche en phosphore que la première fois. Il observe ensuite que ce produit laisse par ébullition avec de l'eau des bases puriques, surtout l'hypoxanthine ; plus tard, il en extrait également la xanthine et la guanine.

La constitution des substances ayant pour origine le noyau de la cellule de levure était donc assez bien connue, tandis que presque rien n'était fait relativement aux matières protoplas-

(1) La méthode employée par SCHROEDER avait déjà fait l'objet d'un brevet pris en 1899 par H. BUCHNER et M. GRUBER. La même année, DORMEYER (*Wochenschr. f. Brauerei*, t. 16, p. 557, 1899) avait conseillé l'emploi d'éther et de chloroforme ; un peu plus tard, HAHN et GERET (*Zeits. f. Biologie*, t. 40, p. 417, 1900) utilisent dans le même but le chloroforme.

(2) SEDLMAYR, *Zeits. f. d. gesam. Brauwesen*, t. 26, p. 381 (1903).

(3) A. KOSSEL, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 3, p. 284 (1879) ; t. 4, p. 290 (1880) et suiv.

miques de cette même cellule. Malgré les difficultés d'une semblable étude, j'ai essayé de l'aborder, afin d'éclairer, s'il était possible, par l'étude des propriétés et de la structure des protéiques de la levure, leur origine et leur formation.

Extraction des protéiques de la levure

La meilleure méthode, semble-t-il, pour isoler les constituants du protoplasma de la levure, consiste à faire exsuder celui-ci hors de l'enveloppe cellulaire, par un phénomène osmotique, ou par déchirure de cette enveloppe. C'est en somme la base des procédés employés pour l'obtention de la zymase.

Dès 1897, E. BUCHNER (1) obtient, par broyage des cellules de levure avec du sable quartzes et de la terre d'infusoires, puis expression sous une pression élevée, un « suc de presse » qui contient, avec les protéiques de la levure, la zymase.

Au début de 1911, A. LEBEDEV (2) fait connaître une méthode beaucoup plus simple : il exprime de la levure fraîche de façon à en retirer la plus grande quantité de l'eau interposée, puis dessèche la masse pulvérulente, soit à la température ordinaire, soit mieux vers 30°. Il suffit de faire macérer la poudre obtenue avec de l'eau pendant plusieurs heures, puis de filtrer sur papier, pour obtenir une macération riche en protéiques et fortement zymasique.

A la fin de la même année, GIGLIONI (3) a montré que de la levure exprimée jusqu'à ce qu'elle soit devenue pulvérulente, puis exposée aux vapeurs de chloroforme, d'éther, d'eucalyptol ou de camphre, se liquéfie et donne par filtration un liquide zymasique.

Cette dernière méthode correspond en somme au procédé de

(1) E. BUCHNER, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 30, p. 117 (1897).

(2) A. LEBEDEV, *C. R. Acad. Sciences*, t. 152, p. 49 (1911).

(3) GIGLIONI, *Atti della Soc. ital. p. Progresso d. Scienze*, octobre 1911.

SCHROEDER pour la préparation des protéiques de levure. En répétant les expériences de ce dernier auteur, il m'a paru que les produits obtenus, ainsi que le rendement, sont sujets à d'assez grandes variations. Les diastases protéolytiques ne sont pas suffisamment entravées dans leur action et par suite le résultat de la préparation est souvent incertain ; c'est ce qui m'a déterminé à abandonner cette méthode.

J'aurais pu, en préparant le suc de presse de BUCHNER, refaire et compléter le travail de WROBLEWSKI ; mais la préparation du suc de levure par broyage et expression est assez pénible, surtout lorsque l'on doit opérer sur des quantités un peu considérables ; elle exige, en plus du matériel spécial indispensable, un personnel suffisant.

Il n'en est plus de même si on emploie le procédé indiqué par LEBEDEV pour la préparation de son suc de levure : cette remarquable méthode présente la commodité et la simplicité les plus grandes et il devient facile d'opérer sur des quantités quelconques. Il ne restait qu'à adapter les données de l'auteur au but spécial poursuivi, c'est-à-dire d'une part extraire et séparer les protéiques de la levure, et d'autre part empêcher leur altération en augmentant le rendement.

Mes premiers essais ont été effectués avec une préparation industrielle de levure obtenue d'après les indications de LEBEDEV (1). La première idée qui se présentait naturellement à l'esprit était de déterminer la proportion relative d'azote sous forme coagulable et non coagulable existant dans la macération préparée d'après LEBEDEV, mais en ajoutant un volume beaucoup plus considérable d'eau, afin de mieux épuiser cette levure.

Dans ce but, 200 grammes de levure SCHRODER, pulvérisée au préalable, ont été délayés dans 600 cc. d'eau et la macération laissée à l'étuve à 35° pendant 4 heures, en agitant de temps à autre. On filtre ensuite sur papier CHARDIN ; après 18 heures on recueille un volume de 190 cc. (liquide A).

(1) Préparée par SCHRODER, de Munich, sous le nom de Trockenhefe.

Le résidu de l'épuisement, resté sur le filtre, est délayé dans 600 cc. d'eau et remis à l'étuve à 35°. Après 4 heures et demie, on filtre ; on recueille 500 cc. (liquide B).

Enfin, le résidu a été de nouveau délayé dans 600 cc. et macéré 5 heures à 35°. On recueille par filtration 450 cc. (liquide C).

Pour déterminer la quantité de substances coagulables contenue dans ces liquides, on en prélève exactement 5 cc. (aussitôt après filtration), on ajoute 50 cc. d'eau et 1 gramme de chlorure de sodium, puis on porte à l'ébullition après addition de quelques gouttes d'acide acétique. La réaction est nettement acide. On filtre sur un petit filtre sans plis, en papier CHARDIN, et on lave jusqu'à ce qu'une goutte, recueillie sur un verre de montre, ne donne plus de louche sensible par le nitrate d'argent. Le coagulum est alors détaché du filtre et séché à 110° jusqu'à poids constant.

D'autre part, les liquides filtrés après coagulation sont évaporés à sec et on y dose l'azote total par la méthode de KJELDAHL.

On trouve la répartition suivante entre les liquides d'épuisement :

A. 1^{er} épuisement. Volume 190 cc.

Coagulum obtenu : 3 gr. 924 0/0, contenant :

azote coagulable	0,628 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,638 »

Poids de coagulum : $3,924 \times 1,9 = 7$ gr. 45.

B. 2^e épuisement. Volume 500 cc.

Coagulum obtenu : 2 gr. 06 0/0, contenant :

azote coagulable	0,335 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,314 »

Poids de coagulum : $2,06 \times 5 = 10$ gr. 30.

C. 3^e épuisement. Volume 450 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 756 0/0, contenant :

azote coagulable	0,121 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,381 »

Poids de coagulum : $0,756 \times 4,5 = 3 \text{ gr. } 40.$

Poids total : $7,45 + 10,30 + 3,40 = 21 \text{ gr. } 15$, soit 10,57 0/0 du poids de la levure séchée à l'air employée.

Comme il est facile de s'en rendre compte, les liquides restant après coagulation renferment à peu près autant d'azote que le coagulum obtenu.

Les liquides A, B et C, aussitôt recueillis, sont additionnés de leur volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium ; il se fait un léger précipité que l'on sépare par filtration et le liquide légèrement acidulé est aussitôt coagulé par chauffage à 100° pendant une demi-heure. Le coagulum lavé à l'eau bouillante est ensuite essoré et lavé jusqu'à disparition du sulfate d'ammonium.

Les liquides A, B et C donnent toutes les réactions de précipitation des protéiques :

Par les acides (sulfurique, nitrique, chlorhydrique, trichloracétique, acétique)	précipité blanc
Par l'acide phosphotungstique	— blanc
— le ferrocyanure acétique	— blanc jaunâtre
— l'acide picrique	— jaune
— l'iodure de potassium et de mercure	— jaunâtre
— l'iodure de potassium et de bismuth	— orangé
— le chlorure mercurique	— blanc
— le chlorure de platine	— jaunâtre
— l'iodure de potassium iodé	— jaune
— l'acide métaphosphorique	— blanc.

Ces liquides, aussi bien que le coagulum purifié, donnent toutes les réactions colorées des protéiques ; ces réactions n'ont pas la même intensité :

Xanthoprotéique, MILLON, biuret	intense
HOPKINS	moyenne
LIEBERMANN	très intense
Aldéhyde d'EHRlich et acide sulfurique	très intense
Soufre	faible.

Il s'agit donc d'une protéine soluble à l'eau et coagulable par la chaleur, vraisemblablement du groupe des albumines.

Le rendement peut-il être augmenté par une extraction pro-

longée pendant un temps plus long, ou par l'emploi de solvants différents? Pour répondre à cette question, on mélange 100 grammes de levure SCHRODER avec 600 cc. d'eau distillée, on laisse macérer 16 heures à 35° et on filtre. On recueille 380 cc. d'un liquide jaune, limpide, qui se prend en masse par chauffage à l'ébullition (liquide A).

Le résidu délayé dans 300 cc. d'eau distillée, est abandonné à 35° pendant 4 heures, puis filtré. On recueille 200 cc. (liquide B).

Enfin, on répète en même temps cette expérience, exactement de la même manière, en remplaçant l'eau distillée par une solution de chlorure de sodium à 10 0/0.

On a les résultats suivants :

Extraction à l'eau distillée.

A. 1^{er} épuisement. Volume 380 cc.

Coagulum obtenu : 2 gr. 196 0/0 contenant :

azote coagulable.	0,351 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,456 »

Poids de coagulum : $2,196 \times 3,8 = 8$ gr. 345.

B. 2^e épuisement. Volume 200 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 763 0/0 contenant :

azote coagulable.	0,122 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,266 »

Poids de coagulum : $0,763 \times 2 = 1$ gr. 526.

Poids total extrait à l'eau : $8,345 + 1,526 = 9$ gr. 871.

Extraction à l'eau salée.

A. 1^{er} épuisement. Volume 380 cc.

Coagulum obtenu : 1 gr. 76 0/0 contenant :

azote coagulable.	0,281 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,456 »

Poids de coagulum : $1,76 \times 3,8 = 6$ gr. 688.

B. 2^e épuisement. Volume 220 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 70 0/0 contenant :

azote coagulable	0,112 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,228 »

Poids de coagulum : $0,70 \times 2,2 = 1$ gr. 54.

Poids total extrait à l'eau salée : $6,688 + 1,54 = 8$ gr. 228.

L'extraction à l'eau salée ne semble pas favorable.

Cet essai est néanmoins répété en comparant l'action de l'eau distillée et de l'eau salée à 10 0/0 à celle d'une solution alcaline renfermant 2 grammes par litre de carbonate de sodium CO_3Na^2 .

On délaie 100 grammes de levure SCHRODER dans 600 cc. de dissolvant, on laisse macérer 7 heures et demie à 35° et on filtre. Le résidu est délayé dans 600 cc. du même dissolvant, abandonné 17 heures à 35° et filtré. Les solutions obtenues sont légèrement acides, excepté dans le cas de la liqueur alcaline, où le premier liquide d'épuisement, d'abord alcalin, devient neutre après quelques heures et légèrement acide à la fin ; le deuxième épuisement reste faiblement alcalin.

Voici les chiffres obtenus :

Extraction à l'eau distillée.

A. 1^{er} épuisement. Volume 370 cc.

Coagulum obtenu : 1 gr. 77 0/0 contenant :

azote coagulable	0,283 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,342 »

Poids de coagulum : $1,77 \times 3,7 = 6$ gr. 549.

B. 2^e épuisement. Volume 440 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 49 0/0 contenant :

azote coagulable	0,078 0/0
azote non coagulable du liquide.	0,214 »

Poids de coagulum : $0,49 \times 4,4 = 2$ gr. 156.

Poids total extrait à l'eau : $6,549 + 2,156 = 8$ gr. 705.

Extraction à l'eau salée.

A. 1^{er} épuisement. Volume 360 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 84 0/0 contenant :

azote coagulable	0,134 0/0
azote non coagulable du liquide	0,344 »

Poids de coagulum : $0,84 \times 3,6 = 3$ gr. 024.

B. 2^e épuisement. Volume 460 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 925 0/0 contenant :

azote coagulable	0,148 0/0
azote non coagulable du liquide	0,285 »

Poids de coagulum : $0,925 \times 4,6 = 4$ gr. 255.

Poids total extrait à l'eau salée : $3,024 + 4,255 = 7$ gr. 279.

Extraction à l'eau alcaline.

A. 1^{er} épuisement. Volume 400 cc.

Coagulum obtenu : 1 gr. 98 0/0 contenant :

azote coagulable	0,317 0/0
azote non coagulable du liquide	0,342 »

Poids de coagulum : $1,98 \times 4 = 7$ gr. 92.

B. 2^e épuisement. Volume 460 cc.

Coagulum obtenu : 0 gr. 705 0/0 contenant :

azote coagulable	0,113 0/0
azote non coagulable du liquide	0,193 »

Poids de coagulum : $0,705 \times 4,6 = 3,243$.

Poids total extrait à l'eau alcaline : $7,92 + 3,243 = 11$ gr. 163.

Comme on le voit, l'extraction à l'eau salée est bien réellement défavorable, mais celle à l'eau alcaline donne des rendements plus élevés qu'avec l'eau pure.

Etant donné que les macérations deviennent peu à peu acides et que cette réaction favorise l'endotryptase de la levure, ainsi que l'ont montré HAHN et GERET (1), il n'y a rien de sur-

(1) M. HAHN et L. GERET, dans *Die Zymasegährung*, 2^e partie, p. 318.

prenant à ce que les matières coagulables soient plus abondantes dans l'extrait fait au moyen d'eau alcaline.

Hahn et Geret donnent les chiffres suivants pour le poids de coagulum formé dans le suc de levure lorsque l'on ajoute des quantités variables de carbonate de sodium :

Carbonate de sodium	Poids de coagulum
0	28,1
q. s. pour neutraliser.	43,0
0,2 0/0 en plus	59,2
0,5 0/0 —	72,3

J'ai essayé de maintenir la réaction à peu près neutre par addition progressive de carbonate de sodium. Une macération de 100 grammes de levure SCHRODER dans 600 cc. d'eau, abandonnée 9 heures dans l'étuve à 35°, a été ramenée toutes les heures à une très légère alcalinité par addition d'une solution concentrée de carbonate de sodium. On a recueilli par filtration 400 cc. de liquide limpide opalescent.

Coagulum obtenu : 2 gr. 22 0/0 contenant :

azote coagulable	0,355 0/0
azote non coagulable du liquide	0,372 »

Poids de coagulum : $2,22 \times 4 = 8$ gr. 88.

Le rendement est visiblement supérieur, mais il est évidemment peu pratique de surveiller sans cesse la macération pour en maintenir la neutralité.

L'influence de quantités croissantes d'alcali sur le rendement a été alors examinée. Trois portions de 100 grammes de levure SCHRODER ont été mises à macérer pendant 8 heures avec 10 parties d'eau alcalinisée respectivement à 0,1 0/0, 0,5 0/0 et 1 0/0. On a obtenu les résultats suivants :

	Azote coagulable 0/0	Azote non coagulable 0/0	Poids de coagulum 0/0	Poids total de coagulum gr.
CO^3Na^2 à 0,1 0/0.	0,131	0,235	0,82	5,25
— 0,5 0/0.	0,224	0,252	1,40	8,68
— 1,0 0/0.	0,174	0,291	1,09	6,54

L'expérience est recommencée dans les mêmes conditions, mais avec de l'eau alcalinisée respectivement à 0,1 0/0, 0,2 0/0 et 0,5 0/0. On a :

	Azote coagulable 0/0	Azote non coagulable 0/0	Poids de coagulum 0/0	Poids total de coagulum gr.
CO ³ Na ² à 0,1 0/0. . .	0,125	0,227	0,78	5,93
— 0,2 0/0. . .	0,147	0,218	0,92	6,99
— 0,5 0/0. . .	0,205	0,213	1,28	9,47

Il est évident que la concentration en carbonate de sodium la plus favorable, dans les conditions de l'expérience (durée, dilution, température) est de 0,5 0/0.

Il fallait aussi fixer le rôle de la température. Dans ce but, on a comparé trois extractions faites respectivement à 35°, 29° et 23° (température de la chambre). La durée de macération a été de 6 heures, pour 100 gr. de levure séchée délayée dans 6 parties d'eau. On a obtenu :

	Azote coagulable 0/0	Azote non coagulable 0/0	Poids de coagulum 0/0	Poids total de coagulum gr.
à 35° (vol. 320 cc.). . .	0,217	0,358	1,37	5,38
à 29° (vol. 320 cc.). . .	0,125	0,315	0,78	2,49
à 23° (vol. 335 cc.). . .	0,072	0,313	0,45	1,51

Le rendement est beaucoup plus élevé à 35°. Il en est de même si on étudie l'action de températures plus élevées. L'expérience a été répétée dans les mêmes conditions, mais à 35°, 40° et 45° :

	Azote coagulable 0/0	Azote non coagulable 0/0	Poids de coagulum 0/0	Poids total de coagulum gr.
à 35° (vol. 420 cc.). . .	0,185	0,358	1,16	4,87
à 40° (vol. 380 cc.). . .	0,177	0,442	1,11	4,22
à 45° (vol. 350 cc.). . .	0,083	0,498	0,52	1,97

On est donc fondé à employer la température de 35°.

Ces conditions, macération dans un assez grand volume de liquide, emploi d'eau alcalinisée avec 0,5 0/0 de carbonate de

sodium, température de 35°, donnent les meilleurs résultats pour une préparation rapide et pratique des protéiques de la levure. Le rendement serait certes amélioré par d'autres précautions : épuisements réitérés, contrôle continu de la réaction légèrement alcaline qu'il faudrait maintenir, etc., mais le procédé deviendrait d'une application vraiment pénible et exigerait trop de temps.

Lorsque l'on opère sur des masses un peu considérables, en plaçant la macération à l'étuve, il ne faut pas oublier que l'opération doit être prolongée assez longtemps, en raison de la lenteur avec laquelle la température s'élève. Pour une macération de 100 gr. de levure SCHRODER dans un litre d'eau alcaline, laissée pendant 8 heures à l'étuve à 35°, l'élévation à partir d'une température initiale de 18° n'est que de 5° en moyenne pendant les deux premières heures et de 4° pendant la troisième. Ce n'est guère qu'après 5 heures que la température est voisine du degré cherché. Aussi est-il préférable d'employer de l'eau préalablement chauffée à 35° si on veut diminuer la durée de la macération.

Séparation des protéiques obtenus

Nous avons vu précédemment (p. 85) que le produit de l'épuisement de la levure séchée de SCHRODER par l'eau donne avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation un léger précipité. S'agit-il d'une globuline ? Quelle est la nature du protéique coagulable par la chaleur ? Est-il formé d'une substance unique ? Autant de questions auxquelles je me suis efforcé de répondre.

Une macération aqueuse de 100 gr. de levure SCHRODER dans 6 parties d'eau distillée, prolongée 7 heures et demie à la température de 35°, a donné, après filtration, 370 cc. de liquide renfermant 1,77 0/0 de protéiques coagulables, soit en tout 6 gr. 55 ; le liquide contient 0,34 0/0 d'azote non coagulable. Une certaine quantité de ce liquide, additionnée de son volume

de solution saturée de chlorure de sodium, ne donne aucun trouble, même après contact prolongé; il ne renferme donc pas de globulines du groupe du fibrinogène.

On prend 100 cc. de la macération primitive et on les sature à froid, en agitant, avec du sulfate de magnésium cristallisé en poudre fine. On termine la saturation à l'étuve à 28°. Le trouble assez abondant qui se forme est séparé par filtration et le dépôt lavé avec un peu de solution saturée de sulfate de magnésium. On redissout dans l'eau la partie insoluble, on filtre, on acidule par l'acide acétique et on chauffe à l'ébullition. Il se fait une coagulation incomplète; le liquide filtré reste en effet opalescent et renferme encore une notable quantité de protéiques. Quant au coagulum resté sur le filtre, lavé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de réaction des sulfates, il pèse après dessiccation 0 gr. 646, soit environ 36 0/0 de la quantité totale. Ce coagulum paraît renfermer une certaine quantité d'une albumine coagulable entraînée par la précipitation saline en même temps qu'un autre protéique, ce dernier ne se séparant pas complètement par chauffage. Il convient donc de faire des essais de purification par précipitations répétées.

Dans ce but, on prépare une nouvelle macération dont on obtient par filtration 560 cc. contenant 9 gr. 57 de protéiques. On précipite par un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, on filtre et le résidu est traité par une petite quantité d'eau. La dissolution est incomplète; on centrifuge et on obtient un premier résidu insoluble R_1 . Le liquide clair, dont le volume est de 92 cc. est reprecipité par son volume de sulfate d'ammonium à saturation: précipité blanc floconneux, qui est traité à deux reprises par peu d'eau, en présence de quelques gouttes de solution saline. On centrifuge et on a un second résidu R_2 . En traitant de même la liqueur claire décantée, on a un troisième résidu insoluble R_3 .

Les liquides résultant des dernières dissolutions par l'eau contenant seulement une petite quantité de sels, étant acidulés par l'acide acétique et portés à l'ébullition, ne donnent qu'un léger louche sans coagulum visible dans le dernier cas. Il

n'existe donc plus d'albumine coagulable. Quant aux résidus R_1 , R_2 et R_3 , insolubles dans l'eau contenant seulement de très petites quantités de sels, ils se dissolvent dans l'eau alcalinisée par 0,5 0/0 de carbonate de sodium. La solution est complète, légèrement opalescente et filtre assez facilement. Par addition d'acide acétique dilué, on a un précipité floconneux blanc qui se redissout en entier dans l'eau alcaline et reprécipite par l'acide acétique.

Ce produit est très riche en azote, comme le montre un essai rapide ; on le fond avec un mélange de potasse et de nitrate de potassium pour y rechercher la présence du phosphore. La recherche est positive et montre la présence d'une quantité notable de cet élément. La recherche du fer est également positive.

Cette expérience, répétée dans les mêmes conditions avec une macération dans l'eau salée à 10 0/0 (provenant de l'extraction indiquée p. 86), donne les mêmes résultats, à savoir que le précipité obtenu par le sulfate de magnésium ou par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ne se redissout après purification que dans les solutions alcalines ; il en est reprécipité par les acides et contient du phosphore et du fer.

Ces caractères ne paraissent pas correspondre avec ceux d'une globuline vraie. Afin de voir si la précipitation saline correspond à celle faite au moyen des acides, on dispose l'expérience suivante : Une macération de 100 gr. de levure SCHRODER dans 6 parties d'eau distillée est maintenue au voisinage de la neutralité par additions fréquentes de carbonate de sodium à 10 0/0. Le séjour à l'étuve à 35° est de 9 heures. On filtre et on recueille 420 cc. de liquide contenant 2,22 0/0 de protéiques coagulables et 0,37 0/0 d'azote non coagulable :

On prélève deux portions égales de 200 cc. de liquide. L'une est précipitée par son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium ; on filtre et on redissout dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 0/0, on filtre à nouveau et on reprécipite par l'acide acétique. Le précipité séché dans le vide sur l'acide sulfurique pèse 0 gr. 24. Quant au liquide primitif, il

est dialysé pendant quelques heures dans des sacs de collodion pour le débarrasser de la plus grande partie du sulfate d'ammonium, puis acidulé et coagulé par la chaleur. Le coagulum lavé et séché pèse 3 gr. 04.

On retrouve ainsi $0,24 + 3,04 = 3$ gr. 28 sur 4 gr. 44 de protéiques.

La seconde portion de 200 cc. est précipitée par 2 cc. d'acide acétique, soit 1 0/0 ; on filtre rapidement et le précipité est redissous dans le carbonate de sodium à 0,5 0/0. On reprécipite par l'acide acétique ajouté goutte à goutte, on lave et on sèche dans le vide sulfurique. Poids obtenu : 0 gr. 19. Le liquide filtré après la précipitation acétique est aussitôt coagulé par la chaleur ; on obtient après lavage et dessiccation 3 gr. 26 de coagulum.

On retrouve ainsi $0,19 + 3,26 = 3$ gr. 45 sur 4 gr. 44 de protéiques.

Comme on le voit, les deux expériences sont comparables. Elles laissent toutes deux place pour une autolyse accentuée qui se traduit par une perte de 23 à 26 0/0 de protéiques.

Il est beaucoup plus commode, pour séparer les deux substances présentes dans les macérations, de recourir à la précipitation acétique. Afin de fixer les proportions relatives de ces protéiques tout en améliorant le rendement, on procéda à l'expérience suivante : Trois échantillons de levure SCHRODER ont été mis à macérer dans 10 parties d'eau alcaline pendant 8 heures à 35°.

A. *Macération dans le carbonate de sodium à 0,1 0/0*

Volume obtenu : 760 cc., contenant 0,78 0/0 de protéiques coagulables, soit en tout 5 gr. 928 et 0,227 0/0 d'azote non coagulable.

On précipite par l'acide acétique ; le précipité essoré et séché dans le vide pèse 1 gr. 31. Le liquide filtré, coagulé par chauffage, donne après lavage et dessiccation un poids de 4 gr. 66 de protéiques.

$$\text{Rapport : } \frac{1,31}{4,66} = \frac{22}{78} = \frac{1}{3,5} \text{ environ.}$$

B. *Macération dans le carbonate de sodium à 0,2 0/0*

Volume obtenu : 760 cc., contenant 0,92 0/0 de protéiques coagulables, soit en tout 6 gr. 992 et 0,218 0/0 d'azote non coagulable.

Poids du précipité acétique : 1 gr. 54.

Poids du coagulum : 6 gr. 04.

$$\text{Rapport : } \frac{1,54}{6,04} = \frac{20}{80} = \frac{1}{4} \text{ environ.}$$

C. *Macération dans le carbonate de sodium à 0,5 0/0*

Volume obtenu : 740 cc., contenant 1,28 0/0 de protéiques coagulables, soit en tout 9 gr. 47 et 0,213 0/0 d'azote non coagulable.

Poids du précipité acétique : 1 gr. 57.

Poids du coagulum : 7 gr. 91.

$$\text{Rapport : } \frac{1,57}{7,91} = \frac{16,5}{83,5} = \frac{1}{5} \text{ environ.}$$

D'une façon générale, on voit que les quantités relatives des deux substances varient peu : cependant, l'élévation du taux de l'alcalinité, qui gêne de plus en plus l'autolyse de la levure, ne paraît pas influencer beaucoup sur la quantité du précipité acétique, tandis qu'elle augmente la teneur en albumine coagulable. On pourrait en conclure que la substance précipitable par l'acide acétique n'est pas produite par un processus d'autolyse ou de dissolution, mais se trouve déjà formée dans le contenu cellulaire. Il en est probablement de même de l'albumine coagulable par la chaleur ; celle-ci apparaît en quantité d'autant plus élevée que l'alcalinité est plus grande parce qu'elle est beaucoup plus attaquable que l'autre protéique, en milieu acide, sous l'action de l'endotryptase. Quoi qu'il en soit, le rendement est le meilleur lorsque l'extraction est faite avec une solution de carbonate de sodium à 0,5 0/0.

Les proportions des deux protéiques, dans l'expérience qui précède, restent voisines de 1 partie du premier pour 4 parties du second. Cependant, elles semblent sujettes à varier dans des limites assez étendues. Le rendement en protéique précipitable par l'acide acétique est plus élevé lorsque l'on opère en plus grand, avec une quantité de levure atteignant 400 à

800 grammes. Il varie aussi avec l'espèce de levure, mais sans qu'il soit possible de fixer une limite certaine en raison de l'impossibilité de supprimer complètement l'action de la protéolyse.

Dans une expérience faite avec 700 grammes de levure SCHRODER, délayée dans 10 parties d'eau alcalinisée avec 0,5 0/0 de carbonate de sodium et macérée 8 heures à 35-36°, j'ai obtenu 49 gr. d'albumine coagulable, lavée et séchée à 110°, et 20 gr. de précipité acétique purifié par dissolution et reprécipitation, lavé et séché dans le vide sulfurique.

D'autre part, j'ai opéré avec la levure pressée du commerce. Deux kilogrammes de cette levure (1), exprimés fortement à la presse et tamisés donnent une poudre blanche qui est séchée en couche mince à l'étuve à 38° pendant 46 heures. On broie finement dans un moulin pour pulvériser les grains de couleur jaune-brun qui se sont formés. La poudre, dont le poids est de 400 gr., est mise à macérer dans 10 parties d'eau contenant 0,5 0/0 de carbonate de sodium pendant 8 heures à l'étuve à 35°. On obtient seulement 22 gr. 8 d'albumine et 9 gr. 5 de précipité acétique purifié par dissolution et reprécipitation comme plus haut. Voici les résultats comparatifs :

	Levure SCHRODER	Levure SPRINGER
Précipité acétique 0/0 de levure . . .	2,9	2,4
Albumine coagulable — — . . .	7,0	5,7
Rapport entre les deux protéiques . .	1 : 2,4	1 : 2,5
Rendement total	9,9	8,1

Je me suis finalement arrêté au procédé suivant pour la préparation de ces protéiques :

La levure préparée selon les données de LEBEDEV est pulvérisée aussi finement que possible par passage dans un moulin à serrage variable, analogue à ceux que l'on emploie pour pulvériser les graines dures. La poudre est délayée avec soin dans 10 parties de solution de carbonate de sodium (carbonate sec et

(1) Il s'agissait de levure SPRINGER, préparée à Maisons-Alfort.

pur) à 0,5 0/0 préalablement chauffée à 37-38°. On abandonne 8 heures à l'étuve à 35° en agitant assez souvent. La masse est alors mélangée et répartie dans des filtres en papier CHARDIN disposés dans une glacière (entre + 2° et + 5°). Le lendemain, les liqueurs filtrées sont réunies et précipitées par addition de 1 0/0 d'acide acétique cristallisable. On vérifie que la précipitation est totale et on décante sur un filtre — ou on centrifuge si possible — de manière à séparer le précipité aussi rapidement que possible. Le liquide clair est additionné de 1 0/0 de sel marin et porté rapidement à l'ébullition.

Le précipité acétique, lavé rapidement avec un peu d'eau, est dissous dans le moins possible de solution de carbonate de sodium à 0,5 0/0. On filtre ou on centrifuge s'il est besoin et la solution est reprecipitée par l'acide acétique en quantité exactement nécessaire. On centrifuge, on lave à plusieurs reprises par centrifugation et on sèche dans le vide sulfurique. Toutes ces opérations doivent être faites aussi rapidement que possible.

Quant au coagulum obtenu par la chaleur, il est recueilli sur un filtre, lavé à l'eau bouillante à plusieurs reprises, essoré et séché à l'étuve à 105-110°.

CHAPITRE II

NATURE DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Etude du précipité fourni par l'acide acétique

Ce corps semble se rapprocher par ses propriétés des nucléoprotéides ou plutôt de ces corps désignés improprement comme paranucléoprotéides et qui pour la plupart rentrent dans le groupe des phosphoprotéines (1). Je l'ai d'abord purifié par plusieurs dissolutions dans l'eau alcaline suivies de précipitations à l'acide acétique, ces opérations étant faites très rapidement grâce à l'emploi d'une centrifugeuse et au voisinage de 0°.

Le produit obtenu, après dessiccation à 33° dans le vide sulfurique, se présente sous forme d'une masse cornée, dure, donnant par pulvérisation au mortier une poudre jaune pâle. Il est insoluble dans l'eau, mais se dissout un peu dans une solution de sel marin à 10 0/0 ; cette solution ne se coagule pas par chauffage. On peut le dissoudre beaucoup plus facilement dans les carbonates alcalins et dans les alcalis très étendus, ainsi que dans l'eau de chaux. Les acides minéraux et l'acide acétique le précipitent de ces solutions. Dans la solution alcaline, l'acide phosphorique fait naître un précipité qui se redissout par un léger chauffage et reparait par refroidissement.

(1) Pour la classification des protéiques, voir *Proceed. of Amer. physiol. Society*, 20^e ann. Comm. (1908).

Dosage de l'azote. — Ce dosage a été fait par la méthode de KJELDAHL, avec la modification de MAQUENNE (distillation avec l'hypophosphite de sodium) sur trois échantillons provenant de trois préparations différentes et préalablement séchés à 110° jusqu'à poids constant.

I. 0 gr. 1715	de substance exigent	9 cc. 9	$\text{SO}_4\text{H}^2 \text{ N/5}$, soit	16,16	0/0 N.
II. 0 gr. 2225	—	—	12 cc. 8	—	16,107 0/0 N.
III. 0 gr. 2690	—	—	15 cc. 55	—	16,18 0/0 N.

Dosage du soufre. — Un premier dosage a été fait par fusion de la substance avec un mélange de 1 partie de nitrate de potassium et 9 parties de carbonate de potassium. On redissout dans l'acide chlorhydrique et après filtration on précipite par le chlorure de baryum. On pèse le sulfate après lavage.

I. 2 gr. 624 de substance donnent 0 gr. 074 BaSO_4 , soit 0,387 0/0 S.

Un second échantillon a été traité par l'acide nitrique bouillant; après dissolution, on neutralise avec du carbonate de sodium, on évapore à sec et on chauffe au rouge dans un creuset de nickel. On reprend par l'acide chlorhydrique et on filtre. Le filtre et le charbon restant étant incinérés, on reprend par l'acide chlorhydrique et les liqueurs réunies sont précipitées par le chlorure de baryum.

II. 1 gr. 640 de substance donnent 0 gr. 0457 BaSO_4 , soit 0,382 0/0 S.

Dosage du phosphore. — La substance préalablement séchée à 110° et pesée a été mélangée intimement avec 0 gr. 20 de magnésie calcinée pure et incinérée avec précaution suivant les indications de VOZARIK (1). On précipite à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien.

I. 0 gr. 6765	de substance	donnent 0 gr. 0425	$\text{P}_2\text{O}_5 \text{ Mg}^2$, soit	1,75	0/0 P.
II. 1 gr. 0480	—	—	0 gr. 0690	—	1,833 0/0 P.

Dosage des cendres. — Les deux échantillons ayant servi aux dosages ci-dessus ont donné, par incinération au four à

(1) A. VOZARIK, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 76, p. 426 (1912).

moufle, au voisinage du rouge sombre, des cendres en quantité minime.

I. 1 gr. 282	de substance donnent	0 gr. 0055	de cendres, soit	0,42 0/0.
II. 1 gr. 454	— — —	0 gr. 0037	— — —	0,25 0/0.

Ces cendres sont alcalines, entièrement solubles, et contiennent du phosphate et du sulfate de sodium et de potassium.

La substance donnent les réactions colorées des protéiques à des degrés variables. Les réactions du biuret, de MILLON, xanthoprotéique, sont intenses. La réaction glyoxylique est très nette; celle de LIEBERMANN passe très rapidement au rouge brun foncé et celle de MOLISCH donne un rouge-violet très intense. Enfin la réaction du soufre (par formation du sulfure de plomb) est naturellement peu intense.

*
* *

Les propriétés de ce corps phosphoré me semblant devoir le rapprocher des substances du groupe de la caséine, je l'ai soumis à une étude comparative avec la caséine et l'ovotelline.

J'ai déjà indiqué la faible solubilité de cette substance dans l'eau salée à 10 0/0 et sa facile dissolution dans l'eau de chaux. Il était intéressant de déterminer la concentration en ions hydrogène nécessaire pour produire le début de la précipitation des trois protéiques à comparer. Dans ce but on a ajouté des quantités croissantes d'acide phosphorique à leurs solutions sodiques, en présence d'une série convenablement choisie d'indicateurs (hélianthine, rouge de méthyle, rouge neutre, naphthol-phtaléine, phénol-phtaléine (1)).

Si on appelle c la concentration en ions hydrogène, on a (SØRENSEN) :

$$c = 10^{-p_H}$$

(1) Je suis redevable de cette collection d'indicateurs à mon ami L. MARGILLAN, à qui j'adresse ici mes meilleurs remerciements.

L'exposant p_H a pour valeur, avec les indicateurs choisis :

	Acide	Alcalin
Hélianthine.	3,4	4,4
Rouge de méthyle	4,2	6,3
Rouge neutre	6,8	8,0
Naphtol-phtaléine.	7,4	8,5
Phénol-phtaléine	8,3	9,2

Avec la phosphoprotéine de levure, on peut voir que la précipitation n'a pas lieu en milieu alcalin à la phénol-phtaléine ; elle se produit en milieu alcalin à l'hélianthine, alcalin au rouge de méthyle mais encore acide au rouge neutre ; le point de précipitation est donc compris entre $p_H = 6,3$ et $p_H = 6,8$.

En opérant de même avec de la caséine purifiée par plusieurs dissolutions et précipitations successives, on trouve que celle-ci précipite en milieu encore alcalin à l'hélianthine et acide au rouge neutre. La précipitation correspond très exactement au point neutre du rouge de méthyle, soit entre $p_H = 4,2$ et $p_H = 6,3$.

J'ai alors préparé de l'ovovitelline de la manière suivante :

Deux jaunes d'œuf très frais, dilués avec 40 cc. de solution de sel marin à 10 0/0, sont épuisés par l'éther à plusieurs reprises, jusqu'à ce que ce dissolvant n'extraie plus qu'une trace infime de corps gras. Le liquide salé est siphonné et précipité par 20 volumes d'eau. On filtre, on essore et on lave le précipité à l'eau distillée ; enfin, on redissout dans le plus petit volume possible d'eau salée à 10 0/0 et on recommence la précipitation encore une fois.

La vitelline obtenue, encore une fois dissoute dans l'eau salée, est de nouveau reprécipitée. Une petite quantité de ce précipité étant dissoute dans quelques gouttes de soude normale, on étudie la précipitation par l'acide phosphorique ; on peut constater qu'elle a lieu en milieu déjà acide à la phénol-phtaléine, mais encore alcalin à la naphtol-phtaléine, soit entre $p_H = 8,3$ et $p_H = 8,5$.

A noter que la vitelline, très peu soluble dans l'eau de chaux, se dissout très facilement dans l'eau salée à 10 0/0 ; cette der-

nière solution est coagulable par la chaleur, à l'inverse de ce qui a lieu pour la caséine et la phosphoprotéine de levure.

Tous les caractères qui rapprochent cette phosphoprotéine de levure de la caséine du lait rendaient nécessaire une comparaison basée sur l'action des présures soit animales, soit végétales.

J'ai choisi comme présure animale une solution d'un comprimé de présure HANSEN du commerce dans 50 cc. d'eau, et comme présure végétale une solution de papayotine de MERCK à 0 gr. 2 pour 50 cc.

Des solutions à 4 0/0 environ de phosphoprotéine de levure et de caséine dans la soude N/10 ont été additionnées d'acide phosphorique, la première jusqu'à légère acidité au rouge neutre, la seconde jusqu'à neutralité au même indicateur.

On place dans un bain réglé à 45° deux tubes contenant 10 cc. de chaque solution auxquels on ajoute respectivement 1 cc. de chacune des solutions de présure. Après quelques instants, il est facile d'observer une forte augmentation de la viscosité des liquides. Si on ajoute à chacun des mélanges, avant de les placer au bain-marie, une goutte de solution de chlorure de calcium, on obtient une coagulation assez rapide dans tous les tubes : avec la papayotine, la coagulation de la phosphoprotéine de levure se produit même avant celle de la caséine ; il se forme des grumeaux qui s'agglomèrent peu à peu en une masse solide.

L'expérience est répétée avec des solutions de caséine, de phosphoprotéine de levure et de vitelline dans de l'eau de chaux saturée. Ces solutions sont à 2 ou 3 0/0 avec les deux premières ; pour la vitelline, moins soluble, la solution est saturée de ce corps. On neutralise au moyen d'acide phosphorique :

Pour la caséine, jusqu'à virage au rose du rouge neutre ($p_H = 7,0$) ;

Pour la protéine de levure, jusqu'au début de virage du rouge neutre ;

Pour la vitelline, jusqu'au voisinage de la neutralité à la naphтол-phtaléine.

On ajoute à 10 cc. des solutions, soit 1 cc. de présure HANSEN,

soit 1 cc. de papayotine MERCK (comme plus haut) et on place au bain-marie à 42°; après une demi-heure, on a les résultats suivants :

	Présure HANSEN	Papayotine
Caséine.	coagulation	coagulation nette
Protéine de levure . .	coagulation incomplète	coagule en grumeaux
Ovovitelline	léger précipité	précipité un peu aggloméré

Il est à noter que l'ovovitelline ne coagule pas avec la présure animale; GERBER a montré que le jaune d'œuf coagule sous l'action de certaines présures végétales (1).

Il est indubitable que la phosphoprotéine de levure coagule en grumeaux sous l'action de la présure. C'est vraisemblablement ce phénomène qui a été observé dans le suc de levure de presse par GERET et HAHN (2) lorsque ce suc est abandonné à l'étuve à 37° et qui est décrit dans les termes suivants par HAHN : « Déjà après deux heures il y a une forte coagulation, en « partie formée de globuline et de nucléine, *presque analogue* « à l'action du lab sur le lait, qui se dépose bientôt. Ce coagu- « lum se dissout presque totalement dans le chlorure de sodium « à 10 0/0 et dans le carbonate de sodium à 10 0/0 » (3).

D'après cette description, on ne peut guère douter qu'il ne s'agisse de la phosphoprotéine que j'ai isolée.

Le même phénomène a dû intervenir dans l'expérience de WROBLEWSKI, lequel, dialysant du suc de levure, a obtenu des flocons volumineux, solubles dans le chlorure de sodium à 10 0/0, qu'il croit être une globuline (4); il est bien probable qu'il s'agit d'une coagulation par la présure du suc de levure, comme dans l'observation de GERET et HAHN.

Présure de la levure. — La présure existe dans la levure,

(1) GERBER, *C. R. Société de Biologie*, t. 74, p. 53 (1913).

(2) GERET et HAHN, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 31, p. 202 (1898).

(3) *Die Zymasegährung*, 2^e partie, p. 293.

(4) WROBLEWSKI, *loc. cit.*

comme l'a démontré BOULLANGER (1) en ensemençant directement le lait avec la levure : la coagulation est complète après deux mois seulement, ce qui indique que cette présure diffuse très lentement. Dans le suc de levure, il est difficile de la mettre en évidence en faisant agir ce suc sur une solution de phosphoprotéine, car la digestion sous l'action de la tryptase intervient souvent avant que la coagulation apparaisse ; on y arrive un peu plus commodément en faisant agir le suc de levure sur du lait.

Pour montrer l'existence de la présure, j'ai utilisé comparativement les trois méthodes suivantes :

a) celle de MORGENROTH (2), dans laquelle le liquide étudié est laissé en contact avec le lait, à la glacière, pendant 24 heures, avant d'être chauffé à 37° ;

b) celle de BLUM et FULD (3), qui opèrent le contact à la température ordinaire et chauffent ensuite comme le fait MORGENROTH ;

c) enfin, le procédé ordinaire, où le mélange est aussitôt porté à 37°-40° et maintenu à cette température jusqu'à coagulation.

Dans aucun cas, les mélanges faits avec 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 5 et 1 cc. de suc de levure pour 10 cc. de lait n'ont montré de coagulation, même après plusieurs heures à 37°. Un mélange fait avec 2 cc. de suc pour 10 cc. de lait donne après 4 heures, par la méthode à chaud, un coagulum en grumeaux volumineux, mais sans prise en masse ; ce mélange ne donne rien par les deux méthodes à froid.

Il fallait donc employer des proportions élevées de suc de levure.

Avec des doses de 2 à 5 cc. de suc pour 10 cc. de lait, j'ai pu obtenir régulièrement la coagulation. Les mélanges étaient amenés à un égal volume (15 cc.) avec de l'eau et placés aussi-

(1) BOULLANGER, *Ann. Institut Pasteur*, t. 11, p. 720 (1897).

(2) MORGENROTH, *Centralbl. f. Bakter.*, t. 26, p. 349 (1899) Voir aussi FULD, *Biochem. Zeits.*, t. 4, p. 54 (1907).

(3) L. BLUM et E. FULD, *Berliner klin. Wochenschr.*, 1903, n° 44.

tôt dans un bain-marie réglé à 38° avec des tubes témoins. Voici les résultats obtenus :

Doses de suc de levure. . . .	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.
Temps de coagulation	4 h. 15'	3 h. 30'	2 h. 20'	1 h. 45'

Dans les deux derniers tubes, le liquide devenait très visqueux avant de se prendre en masse. Les tubes témoins n'ont montré aucune tendance à la coagulation.

L'existence d'une présure, à la vérité peu active, me semble donc démontrée dans le suc de levure préparé par le procédé de LEBEDEV.

*
* *

Les rapports entre la caséine, la phosphoprotéine de levure et l'ovovitelline sont résumés dans le tableau suivant :

	caséine du lait	phosphoprotéine de levure	vitelline de l'œuf
Solubilité dans l'eau . . .	insoluble	insoluble	insoluble
— — NaCl à 10 0/0 .	presque insoluble	peu soluble	très soluble
— — l'eau de chaux .	très soluble	assez soluble	très peu soluble
Valeur de p_H au début de la précipitation. .	4,2 - 6,3	6,3 - 6,8	8,3 - 8,5
Coagulation par la pré- sure	complète	incomplète	nulle

Le produit obtenu par précipitation acétique des macérations de levure a donc bien sa place entre la caséine et la vitelline, mais plus près de la première.

Son caractère de protéine phosphorée est encore affirmé par l'expérience suivante. On dissout 5 grammes de produit (séché à 37° dans le vide sulfurique) dans 500 cc. de soude à 10/0 et on abandonne à l'étuve à 37°. Après 48 heures, on prélève 100 cc. de liquide dans lequel on dose le phosphore minéral. Pour cela, on acidule par l'acide acétique et on porte à l'ébullition. On filtre, on lave le précipité et dans les

liqueurs réunies, additionnées d'acide citrique, on précipite l'acide phosphorique à la manière habituelle.

On obtient 0 gr. 022 de pyrophosphate magnésien correspondant à 0 gr. 03066 de phosphore pour la totalité du liquide. Comme le produit contenait 10,01 0/0 d'eau, on peut calculer d'après sa teneur en phosphore de 1,835 0/0 que la préparation renfermait en tout 0 gr. 08237 de phosphore. Il est donc passé en solution, sous l'action de la soude, et à l'état minéral, 37,1 0/0 du phosphore total.

Après 5 jours, on obtient avec 100 cc. de liquide prélevé un poids de 0 gr. 0345 de $P^2O^7Mg^2$, soit en tout 0 gr. 04808 de phosphore minéral. L'action de la soude a solubilisé 58,2 0/0 du phosphore total.

Après 9 jours, 100 cc. de liquide donnent 0 gr. 039 de $P^2O^7Mg^2$, correspondant à 0 gr. 05435 de phosphore pour la totalité de la solution, soit une proportion de 65,8 0/0 du phosphore total solubilisé à l'état minéral.

Ce phénomène de la transformation progressive du phosphore des phosphoprotéines en phosphore minéral sous l'action de la soude étendue, signalé et étudié par PLIMMER et SCOTT (1) pour la caséine et la vitelline, se retrouve donc avec le produit que j'ai extrait des macérations de levure. Je propose de donner à cette protéine phosphorée le nom de *Zymocaséine* (de ζύμη, levain), sous lequel je la désignerai désormais (2).

(1) PLIMMER et SCOTT, *J. of the chem. Society*, t. 93, p. 4699 (1908).

(2) Il peut être intéressant de rappeler que SCHLOSSBERGER (*loc. cit.*) en traitant la levure par la potasse étendue, et précipitant la solution obtenue par l'acide sulfurique, avait préparé un corps vraisemblablement de nature protéique, contenant environ 14 0/0 d'azote, qu'il avait comparé à une variété de caséine. S'agissait-il de zymocaséine plus ou moins altérée ? Je n'oserais l'affirmer ; en tout cas, on pourrait risquer la même hypothèse avec plus de vraisemblance au sujet du corps isolé par BÉCHAMP (*C. R. Acad. Sciences*, t. 78, p. 645, 1874) des produits de l'autolyse de la levure en présence de phénol : cette substance, dit-il « est bien différente de l'albumine « des œufs ; c'est de la caséine qu'elle se rapproche le plus : comme « celle-ci, elle se dissout aisément dans le carbonate de sodium après sa « coagulation, ce que ne fait pas l'albumine coagulée ; elle est précipitée de « cette solution par l'acide acétique. »

Etude du coagulum fourni par chauffage

Le liquide dont on a séparé la zymocaséine par l'acide acétique donne par chauffage un abondant coagulum, blanc, compact, semblable à l'ovalbumine obtenue par coagulation.

Ce corps peut être également obtenu par précipitation au moyen du sulfate d'ammonium, employé à saturation. On recueille le précipité par centrifugation et on le lave avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. On peut le débarrasser de ce sel par dialyse dans un sac de collodion.

C'est une substance blanche, soluble dans l'eau, non précipitable par l'acide acétique, ni par le sulfate de magnésium saturé ou le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Elle présente donc les caractères des albumines.

La solution neutre ou légèrement acide commence à se troubler à 39-40° et donne à 41° un coagulum assez léger, mais très net (1). Si on filtre, on a un liquide limpide qui se trouble de nouveau à 49° et coagule en partie à 50°. Après filtration, on a un liquide clair donnant une coagulation très abondante à partir de 55° jusqu'à 58°. Le liquide donne encore un léger coagulum à 61°, puis reste limpide jusqu'à 68°; on a enfin une légère coagulation de 68° à 70°. Il ne se produit plus de trouble ensuite jusqu'à 98°. Pratiquement, si on ne procède pas par fractionnement, la coagulation paraît se poursuivre de 40° à 70°.

*
* *

En étudiant le suc de levure de presse, WROBLEWSKI (2) avait déjà signalé ces coagulations successives. Il les attribuait à une série de protéines distinctes, coagulant chacune pour son

(1) Ce fait a été d'abord signalé par E. BUCHNER, qui a constaté que le suc de levure se coagule déjà à 40° (*Die Zymasegährung*, p. 292).

(2) WROBLEWSKI, *loc. cit.*

compte, à 41°, 51°, 56°, 59°, 62° et 68°. La première, d'après lui, pouvait être coagulée et séparée par agitation avec de l'éther dès la température de 35° ou être précipitée par l'acide acétique. Il ne m'a pas été possible de vérifier cette dernière assertion : la précipitation acétique du suc de levure sépare en effet la zymocaséine, qui n'est pas coagulable par la chaleur ; l'albumine restante commence à coaguler dès 41° si on a opéré assez vite pour éviter l'autolyse, ou si comme je l'ai fait, on procède à toute la série des opérations dans une pièce dont la température reste comprise entre 2° et 3°. Ainsi que l'a remarqué WROBLEWSKI, l'action de l'endotryptase a pour effet de supprimer les coagulations successives en élevant en quelque sorte la température de coagulation. Dans les idées de cet auteur, le ferment digestif attaquerait d'abord la protéine coagulant à 41°, puis celle qui coagule à 51° et ainsi de suite.

Il ne me paraît pas possible d'admettre cette manière de voir ni cette multiplicité de protéines qui seraient caractérisées seulement par leurs températures de coagulation. Ainsi que je l'ai déjà indiqué (voir p. 91 et suiv.), je n'ai pu obtenir de globuline par précipitation du suc de levure au moyen du sulfate d'ammonium à demi-saturation, mais seulement la même substance que par la précipitation acétique, c'est-à-dire la zymocaséine ; or, d'après WROBLEWSKI, la protéine coagulant à 41° est précipitée par l'acide acétique, tandis qu'elle ne l'est pas avec une concentration de sulfate d'ammonium correspondant aux $\frac{2}{3}$ de la saturation. Il y a là une contradiction qui s'explique peut-être par l'intervention, dans les expériences de WROBLEWSKI, des ferments autolytiques si actifs du suc de levure.

Quant aux coagulations successives de l'albumine de levure, elles peuvent, à mon avis, être dues simplement à des différences d'état physique ou, si l'on veut, de grosseur micellaire. L'endotryptase fait disparaître d'abord les points de coagulation les plus bas, parce qu'elle commence par modifier l'état des particules d'albumine avant de procéder à des ruptures profondes de l'édifice moléculaire. Cette modification se tradui-

rait donc par une élévation du point de coagulation. Il n'y a rien de surprenant, étant donné les conditions dans lesquelles est obtenue cette albumine de levure, qu'elle renferme toujours un mélange de particules à divers états d'agrégation ; les diastases cellulaires, en effet, agissent sur elle à partir du moment où la cellule rompue est mise en contact avec l'eau de la macération (1).

Nous connaissons d'ailleurs un cas assez analogue : la leucosine du blé, qui est également une albumine, donne des solutions qui se troublent entre 48° et 50° et laissent séparer un coagulum à 52°. Le liquide chauffé jusqu'à 65° montre une nouvelle coagulation avec précipité se séparant à 73° jusqu'à la température de 82° (2).

Il est intéressant de rapprocher des données qui viennent d'être signalées les faits relatifs à la température mortelle de la levure. Les déterminations de E. KAYSER (3) dont la précision est indiscutable, montrent que cette température mortelle, pour les levures à l'état humide, est d'environ 35°, certaines levures périssant entre 30° et 35°, d'autres seulement à 65°. D'autre part, la fermentation cesse à peu près de se produire à partir de 40° ; en élevant lentement la température, on peut cependant l'observer encore, quoique faiblement, jusqu'à 45°.

La fermentation cesse donc lorsque la coagulation des albumines du protoplasma commence ; mais la mort n'arrive que si la température s'élève jusqu'à 55°, sans doute parce que la coagulation n'est définitive qu'à partir de ce point : en-dessous de cette température, la cellule est encore capable de modifier l'état d'agrégation de ses protéines, créé artificiellement par le chauffage, pour le ramener au point qui lui convient.

(1) Je signalerai, à propos des températures de coagulation, que HENRY et AULD, avec le suc de presse, ont obtenu des températures différentes de celles de WROBLEWSKI : pour eux, la coagulation commence seulement à 48°, puis a lieu à 55°, 58° et 66° (*Proc. Royal Society*, sér. B, t. 76, p. 568 ; 1905). En opérant avec le suc de macération de LEBEDREW, j'ai obtenu la même série de températures que WROBLEWSKI.

(2) OSBORNE, *The vegetable Proteins*, London 1916, p. 45.

(3) E. KAYSER, *Ann. Institut Pasteur*, t. 3, p. 513 (1889).

*
* *

Passons maintenant à l'étude de la composition élémentaire de la protéine coagulable.

Dosage de l'azote. — Il a été fait comme précédemment par la méthode de KJELDAHL.

- | | | | | | | | | |
|-----|-----------|----------------------|----------|-------------------------|-----|------|-------|--------|
| I. | 0 gr. 205 | de substance exigent | 12 cc. 0 | SO^4H^2 | N/5 | soit | 16,39 | 0/0 N. |
| II. | 0 gr. 489 | — | — | 41 cc. 0 | — | — | 16,29 | 0/0 N. |

Dosage du soufre. — La substance est traitée par l'acide nitrique bouillant, la masse neutralisée par le carbonate de sodium, etc., comme plus haut (p. 99).

- | | | | | | | | |
|-----|------------|----------------------|-----------|-----------------|------|-------|--------|
| I. | 4 gr. 0065 | de substance donnent | 0 gr. 069 | BaSO^4 | soit | 0,94 | 0/0 S. |
| II. | 4 gr. 205 | — | — | 0 gr. 078 | — | 0,888 | 0/0 S. |

Dosage du phosphore. — Un poids de 0 gr. 4155 de substance, fondu avec un mélange de carbonate et de nitrate alcalins, a donné par précipitation un dépôt à peine sensible de phosphate ammoniaco-magnésien impossible à peser.

Un second échantillon, pesant 2 gr. 470, est traité par l'acide nitrique bouillant; après neutralisation par le carbonate de sodium, on évapore, on chauffe au rouge, on reprend par l'acide nitrique étendu et on filtre. Le charbon étant détruit et les liqueurs réunies évaporées à environ 100 cc., on ajoute 60 cc. de solution de nitrate d'ammonium à 34 0/0 et 6 cc. d'acide nitrique pur. On chauffe et on précipite par 200 cc. de molybdate d'ammonium à 3 0/0. Le précipité jaune recueilli et lavé est dissous dans un excès d'ammoniaque; on neutralise par l'acide chlorhydrique, on ajoute 1 gramme d'acide citrique et 5 cc. de solution de chlorure de magnésium à 10 0/0 puis un excès d'ammoniaque. Le liquide ne se trouble qu'après un certain temps d'agitation. Après 24 heures, le précipité est recueilli et donne 0 gr. 0061 de pyrophosphate de magnésium correspondant à 0,069 0/0 de phosphore.

Cette quantité reste très minime et la teneur certainement plus faible encore du premier échantillon analysé laisse supposer que le phosphore ne s'y trouve que d'une façon acciden-

telle ; sa présence ne doit être attribuée qu'aux difficultés d'une purification complète du produit soumis à l'analyse.

Dosage des cendres. — Le produit a été incinéré au four à moufle à une température voisine du rouge naissant.

I.	4 gr. 9455 de substance donnent	0 gr. 0070 de cendres, soit 0,55 0/0.
II.	4 gr. 3880 — — —	0 gr. 0041 — — 0,29 0/0.

Les cendres sont alcalines et contiennent des carbonates alcalins.

L'albumine de levure donne les réactions de précipitation des protéiques, en particulier avec les réactifs alcaloïdiques et les acides minéraux, y compris l'acide métaphosphorique. Ce dernier paraît donner une combinaison définie contenant près de 30/0 de phosphore, analogue aux combinaisons du même genre étudiées par E. FULD (1).

Cette protéine donne également les réactions colorées usuelles : biuret, MILLON, xanthoprotéique, avec intensité. La réaction glyoxylique est particulièrement intense. Celle de LIEBERMANN se produit facilement en rouge violacé et celle de MOLISCH en rouge brun. Enfin, la réaction du soufre est nettement positive.

Il s'agit donc bien d'une substance du groupe des albumines. Sa présence en quantité importante dans la levure présente un grand intérêt. Par analogie avec les appellations utilisées actuellement pour les protéines végétales, je propose de désigner ce corps sous le nom de *cérévisine* (de *Sacch. cerevisiæ*, nom donné à la levure de bière par MEYEN et REESS).

Origine des protéiques de la levure

Avant de continuer l'étude de ces protéiques, il est nécessaire de savoir d'où ils proviennent et s'ils peuvent être regardés comme des constituants normaux du protoplasma de la levure. En effet, ces substances sont extraites dans des conditions qui

(1) E. FULD, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, t. 2, p. 155 (1902).

les exposent à être altérées par l'action des ferments autolytiques et en particulier de l'endotryptase.

Examinons point par point la méthode de préparation. La levure est d'abord lavée et elle perd dans ces conditions une partie de ses matériaux azotés solubles, comme en témoigne la diminution bien connue de sa teneur en azote total. Mais ce processus ne va pas jusqu'à l'épuisement complet, jusqu'à la mort de la cellule, qui reste parfaitement capable de vivre et de se reproduire après ce lavage : son protoplasma, dans ses constituants essentiels, n'est donc pas altéré. Le séchage, qui suit le lavage et l'expression à la presse, agit beaucoup plus énergiquement sur la levure. En effet, après dessiccation dans les conditions indiquées par LEBEDEW, on trouve un grand nombre de cellules dont l'enveloppe s'est rompue, comme l'ont constaté BEIJERINCK et VAN HEST (1). La macération qui intervient ensuite n'augmente pas le nombre de ces cellules ouvertes, d'après les mêmes auteurs ; mais cette macération a pour effet de mélanger à l'eau le protoplasma ainsi mis en contact avec le dissolvant. Dans ces conditions, on pouvait penser que les processus autolytiques, se produisant avec énergie, viennent simplifier, solubiliser, les constituants protoplasmiques, de sorte que les protéiques présents dans la macération et que j'ai isolés ne seraient que des produits d'autolyse et n'auraient aucune existence réelle dans la cellule.

La méthode de LEBEDEW pour l'extraction d'un suc de levure riche à la fois en protéiques et en zymase présente l'avantage d'une simplicité et d'une commodité remarquables, en même temps qu'elle nécessite seulement un matériel d'usage courant et peu coûteux. Diffère-t-elle profondément, quant à ses résultats, de celle de BUCHNER-HAHN ? Il ne le semble pas si on se reporte au travail cité plus haut de BEIJERINCK et VAN HEST. D'après ces auteurs, la levure préparée selon la méthode de LEBEDEW, c'est-à-dire lavée et séchée, renferme un grand nombre de cellules déchirées et l'activité du suc obtenu est propor-

(1) BEIJERINCK et VAN HEST, *Folia microbiologica*, t. 4, p. 107 (1916).

tionnelle au nombre de cellules dont la paroi est rompue, comme dans la méthode de BUCHNER-HAHN. Par conséquent, dans les deux cas, il s'agit de produire la rupture de la paroi cellulaire; LEBEDEV extrait ensuite le suc par macération aqueuse, tandis que BUCHNER et HAHN emploient l'expression. Les suc de levure obtenus par les deux méthodes sont comparables et les résultats trouvés pour l'un valent pour l'autre. Or, GERET et HAHN (1) font remarquer que l'autolyse n'agit presque pas sur le suc concentré et que celui-ci ne se modifie presque plus s'il est évaporé dans le vide au tiers de son volume. D'autre part, l'endotryptase est fortement gênée par la neutralisation du liquide et n'agit plus en milieu alcalin.

Dans les macérations en milieu alcalinisé par le carbonate de sodium, telles que je les ai employées, il ne peut donc guère se produire d'attaque des protéiques présents dans la cellule. Il est par suite extrêmement probable que la zymocascéine est une phosphoprotéine existant dans le protoplasma et non un produit d'altération.

Lorsque ce corps a été précipité par l'acide acétique, l'endotryptase se trouve dans des conditions très favorables pour agir sur l'albumine restée en solution ; aussi convient-il, comme je l'ai indiqué, d'opérer rapidement et de porter aussitôt à l'ébullition pour détruire la diastase protéolytique et coaguler la cérévisine. On peut en somme, jusqu'à preuve du contraire, admettre également que cette dernière existe dans la cellule de levure.

Néanmoins, me rappelant que BUCHNER a tenté de préparer le suc de levure par congélation de celle-ci avec la neige carbonique et broyage au mortier, j'ai essayé d'obtenir par ce procédé un suc riche en protéiques. Dans ce but, j'ai utilisé l'air liquide (2).

On introduisait dans un grand mortier 100 grammes de levure

(1) GERET et HAHN, *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 31, p. 2335 (1898).

(2) BUCHNER avait d'abord employé l'air liquide ; il y a renoncé par la suite, l'évaporation de ce liquide pouvant laisser un résidu d'oxygène avec lequel des explosions sont possibles (*Die Zymasegährung*, p. 67).

pressée du commerce de préparation récente ; l'introduction avait lieu par portions assez petites, qui étaient aussitôt congelées avec de l'air liquide et triturées énergiquement. On continuait de faire arriver l'air liquide, par toutes petites fractions, la trituration étant poursuivie pendant 20 minutes. La poudre obtenue était abandonnée à un réchauffement progressif ; lorsqu'elle commençait à devenir pâteuse, on la délayait dans 20 cc. d'eau refroidie à 1-2°, et on essorait vivement dans un entonnoir de BUCHNER bien refroidi garni d'un disque de papier CHARDIN, le liquide étant recueilli dans un vase entouré de glace pilée. Après environ 40 minutes, on a recueilli 30 cc. d'un liquide jaune clair, visqueux, opalescent, qui coagule en masse par chauffage à l'ébullition.

Ce liquide précipite par addition ménagée d'acide acétique : le précipité recueilli en quelques minutes par la centrifugation présente tous les caractères de la zymocaséine. D'autre part, deux portions du liquide obtenu, additionnées, l'une de présure, l'autre de papayotine, dans les conditions de l'expérience rapportée p. 102, donnent un coagulum abondant après deux heures de séjour à 38°.

Le liquide clair obtenu après centrifugation du précipité acétique commence à se troubler dès qu'on le chauffe à 39-40° ; à 41°, il se forme un précipité très apparent. Après filtration, le liquide coagule de nouveau à 50°. Chauffé à l'ébullition, il donne un coagulum abondant identique à l'albumine de levure ou cérévisine isolée des macérations.

Comme on le voit, la zymocaséine et la cérévisine existent dans le suc de levure préparé par congélation et mis à l'abri des transformations autolytiques ; on est donc en droit d'admettre que ces substances préexistent dans la levure vivante.

Est-il possible de préciser davantage et d'attribuer à chacune de ces substances une signification physiologique déterminée ? Pour la cérévisine, il est bien probable que cette albumine représente un constituant important du protoplasma proprement dit des cellules de levure. Quant à la zymocaséine, est-elle aussi un constituant normal du protoplasma ou s'agit-il

d'une substance de réserve pouvant disparaître ou augmenter suivant les conditions de la nutrition ?

D'après les idées de PFEFFER, on pourrait admettre la première hypothèse. Pour ce physiologiste, en effet, « les corps « plastiques qui semblent jouer, en général, un rôle prépondérant dans la constitution du cytoplaste doivent être regardés comme des nucléines pauvres en acide phosphorique » (1). Il nous faut évidemment rectifier cette dernière assertion : les corps dont il s'agit sont des phosphoprotéines, comme ces substances signalées par divers auteurs et rangées par eux à côté de la vitelline (Ainsi par exemple, REINKE (2), dans son analyse du plasmode d'*Æthalum septicum* y indique la présence de 5 0/0 de vitelline).

La zymocaséine peut aussi n'être qu'un produit de réserve accumulé par la cellule. On sait que la levure renferme des inclusions ou corpuscules métachromatiques analogues à ceux qui ont été trouvés par BABES (3) dans le bacille diphtérique et aussi aux grains rouges de BUTSCHLI. GUILLIERMOND, qui a surtout attiré l'attention sur les corpuscules métachromatiques de la levure (4), les regarde comme des substances de réserve. Je me suis demandé si la zymocaséine ne provenait pas de ces inclusions. Leur nature chimique ne paraît pas en effet bien déterminée : dans son travail de 1902, GUILLIERMOND incline à penser qu'il ne s'agit pas de protéiques, parce que le réactif de MILLON ne les colore pas. Plus tard, il est cependant amené à affirmer leur nature de corps azotés (5), se basant sur les travaux de A. MEYER (6) et de KOHL (7). Ces auteurs les considèrent comme des dérivés de l'acide nucléique, mais comme le fait avec juste raison remarquer GUILLIERMOND, ce n'est là qu'une

(1) W. PFEFFER, *Physiologie végétale*, trad. Friedel, t. 1, p. 56 (1905).

(2) REINKE, *Unters. a. d. bot. Laborat. in Göttingen*, t. 2, p. 54 (1881).

(3) BABES, *Zeits. f. Hygiene*, t. 5, p. 173 (1889) ; t. 20, p. 412 (1895).

(4) GUILLIERMOND, *Thèse de Paris et Lyon* (1902).

(5) GUILLIERMOND, *Les Levures* (Enc. Scientif.), Paris 1912, p. 76.

(6) A. MEYER, *Botan. Zeitung*, t. 62, p. 113 (1904).

(7) KOHL, *Die Hefepilze*, Leipzig 1908.

simple hypothèse qui attend une démonstration formelle.

Le caractère le plus net des corpuscules métachromatiques est de donner après fixation une coloration élective avec le bleu de méthylène et le bleu de toluidine ; la teinte obtenue varie du rouge au violet. Avec l'hématoxyline ou l'hématéine, ils donnent une coloration d'un rouge vineux.

Ils se colorent par la fuchsine de ZIEHL et la coloration ne disparaît pas sous l'action de l'acide sulfurique à 1 0/0 ; ce même réactif n'a pas non plus d'action sur la coloration donnée par le bleu de méthylène (1).

J'ai essayé de reproduire ces colorations sur la zymocaséine, étalée en couche mince sur lame et fixée au formol. Dans ces conditions, le bleu de méthylène donne une teinte bleue, à peine mélangée de violet ; le bleu de toluidine, du violet-bleu, sans tendance marquée vers le rouge. Comme colorant hématoxylique, j'ai employé l'hémalun acide d'ERLICH, qui m'a donné une teinte rouge vineux en milieu acide, virant au violet rougeâtre par passage dans l'eau calcaire.

La fuchsine de ZIEHL colore intensément en rouge, et la teinte ne disparaît pas par l'acide sulfurique à 1 0/0. Ce dernier atténue la couleur bleue produite par le bleu de méthylène, mais sans la faire disparaître.

Il est évidemment impossible de tirer une conclusion ferme de ces résultats, mais il faut bien remarquer qu'ils n'excluent pas l'hypothèse émise. La question appelle de nouvelles recherches. A noter que la cérévisine, soumise comparativement aux mêmes essais de coloration, se comporte comme une substance protoplasmique ; elle prend avec les bleus une très légère teinte bleutée, et ne se colore pas avec l'hémalun. La zymocaséine, au contraire, absorbe énergiquement les colorants dits basiques.

(1) GUILLIERMOND et MAWAS, *C. R. Soc. Biologie*, t. 64, p. 307 ; GUILLIERMOND et BEAUVERIE, *Ibid.*, p. 482 (1908).

Autres essais de séparation des protéiques de la levure

SCHROEDER a indiqué que la levure plasmolysée par l'éther donne un suc assez riche en protéiques (voir p. 80). J'ai essayé de préparer par ce procédé les protéiques de levure. Dans ce but, 100 gr. de levure pressée ont été arrosés avec 10 cc. d'éther pur et délayés dans une éprouvette à pied. La liquéfaction est très rapide. On abandonne pendant 24 heures à la température ordinaire, puis on laisse 48 heures à la glacière en présence de 800 cc. d'eau thymolée. Le liquide filtré ne donne aucune coagulation par chauffage.

L'expérience est recommencée, mais après 24 heures à la température ordinaire on ajoute 500 cc. d'eau thymolée, on laisse à la glacière jusqu'au lendemain, on décante et on filtre. Le liquide filtré, coloré en jaune pâle, donne un précipité par l'acide acétique; après séparation de ce précipité, on obtient par chauffage un coagulum assez faible.

Les produits isolés sont identiques à la zymocaséine et à la cérévisine, mais les rendements sont de beaucoup inférieurs à ceux que j'ai indiqués plus haut (1).

VAN LAER a signalé depuis longtemps la liquéfaction de la levure en présence de sel marin (2). J'ai essayé des mélanges de levure pressée avec du chlorure de sodium en poudre fine, dans la proportion de 2,5 0/0, 1,5 0/0 et 1 0/0; la liquéfaction est rapide et le mélange mousse abondamment par suite de la fermentation du glycogène. Après liquéfaction totale, on ajoute de l'eau et on laisse macérer pendant 24 heures, puis on filtre. Le liquide ne donne pas de coagulation par chauffage.

L'autolyse est donc assez rapide dans ces conditions pour détruire les protéiques qui pourraient passer en solution. J'ai

(1) Je ferai observer que SCHROEDER n'a pas cherché à séparer les substances contenues dans la macération qu'il obtient; il utilise uniquement le produit global.

(2) VAN LAER, *Chem. Centralbl.*, t. 1, p. 352 (1901).

songé à utiliser les propriétés antiprotéolytiques de la résorcine, signalées par PALLADIN (1) et, pour cela, j'ai liquéfié 100 gr. de levure pressée au moyen de 3 gr. de chlorure de sodium pulvérisé mélangé avec 2 gr. de résorcine. La liquéfaction se produit aussitôt. Après séjour de 24 heures à la glacière, la masse est délayée dans 500 cc. d'eau ; on laisse déposer, on filtre. Le liquide clair ne se trouble ni par addition d'acide acétique, ni par chauffage à l'ébullition.

Une série d'expériences analogues, qu'il est inutile de rapporter en détail, dans lesquelles les conditions de durée, de concentration et de température ont été variées, n'a également donné aucun résultat.

J'ai alors essayé d'utiliser le pouvoir dissolvant de l'urée pour amener le passage des protéiques à travers la membrane de la levure. Des mélanges de 20 gr. de levure pressée avec 50 cc. de solutions d'urée respectivement à 1 0/0, 3 0/0 et 10 0/0 ont été préparés et abandonnés pendant 15 heures à la température ordinaire (17°). Par filtration, on obtient un liquide clair, devenant louche par chauffage à l'ébullition ; ce louche s'accroît par addition de quelques gouttes d'acide trichloracétique.

L'expérience est recommencée avec les mêmes quantités d'urée, mais les macérations sont placées à l'étuve à 33° pendant 16 heures. Le liquide obtenu par filtration du mélange contenant 1 0/0 d'urée précipite légèrement par ébullition. Comme on le voit, les résultats sont assez peu encourageants ; la quantité d'urée nécessaire rendrait au surplus le procédé coûteux et inapplicable.

J'ajouterai que si on mélange directement de la levure pressée avec 1/10 de son poids d'urée pulvérisée, il y a liquéfaction très rapide. Au bout d'une heure, la masse additionnée d'eau et filtrée donne un liquide opalescent qui ne fournit aucun précipité, ni par l'acide acétique, ni par chauffage.

Il est vraisemblable que dans toutes ces expériences de plas-

(1) PALLADIN, *Biochem. Zeitschr.*, t. 44, p. 318 (1912).

molyse les protéiques restent dans l'intérieur de la cellule ; il passe seulement à l'extérieur des composés azotés plus simples, résultant peut-être d'une exagération des processus autolytiques à l'intérieur de la membrane. Ces composés azotés appartiennent presque tous au groupe des acides aminés, soit monoaminés, soit diaminés.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE LA ZYMOCASÉINE ET DE LA CÉRÉVISINE

Les seules données qu'il soit possible de se procurer sur la constitution des protéiques extraits de la levure nous seront fournies par l'hydrolyse de ces produits. J'ai eu recours d'abord à l'hydrolyse acide.

Répartition de l'azote

Pour étudier en premier lieu la répartition de l'azote dans la molécule, j'ai utilisé la méthode décrite par HAUSMANN (1). Elle consiste, en principe, à hydrolyser le protéique en expérience par ébullition avec un acide, neutraliser, doser l'ammoniaque formée, puis séparer les acides aminés en deux groupes au moyen de l'acide phosphotungstique.

Voici le mode opératoire suivi, qui correspond à peu près à celui indiqué par OSBORNE et HARRIS (2) :

On prend environ 1 gr. de substance, préalablement séchée jusqu'à poids constant et pesée exactement et on fait bouillir pendant 8 heures au réfrigérant ascendant avec 20 cc. d'acide chlorhydrique concentré. Le liquide évaporé au bain-marie au

(1) HAUSMANN, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 27, p. 95 (1899) et t. 29, p. 136 (1900).

(2) OSBORNE et HARRIS, *J. of amer. chem. Society*, t. 25, p. 323 (1903).

tiers de son volume est neutralisé au moyen de magnésie pure calcinée ; on ajoute un excès de magnésie et on distille, afin de déplacer l'ammoniaque, qui est titrée au fur et à mesure de son dégagement.

Le résidu, additionné d'acide chlorhydrique jusqu'à réaction acide, est concentré au bain-marie ; on sépare par filtration les substances humiques insolubles dans lesquelles on dose l'azote par la méthode de KJELDAHL, et le liquide filtré, amené au volume de 100 cc., est additionné de 5 cc. d'acide sulfurique puis précipité par un léger excès d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 0/0 dans l'acide sulfurique à 5 0/0. Après 24 heures, on filtre, on lave avec une solution sulfurique étendue d'acide phosphotungstique, et on dose dans le précipité l'azote basique, attribuable surtout aux acides diaminés. Un dosage fait dans le liquide résiduel donne l'azote des acides monoaminés et permet le contrôle de l'opération entière.

L'opération faite dans ces conditions donne des résultats assez comparables, ainsi qu'il est facile de s'en rendre compte en pratiquant deux déterminations successives.

1° *Zymocaséine*. — On utilise deux échantillons séchés dans le vide sulfurique, pulvérisés et rendus bien homogènes. On sèche environ 2 gr. de chacun à 110° et on pèse deux fractions I et II. On a les résultats suivants :

	I	II
	—	—
	gr.	gr.
Poids de substance	0,958	0,943
Trouvé azote ammoniacal	0,01064	0,0105
Correspondant en 0/0 à	1,11	1,11
Trouvé azote des substances humiques	0,00623	0,00392
Correspondant en 0/0 à	0,65	0,41
Trouvé azote du précipité phosphotungstique	0,0413	0,0396
Soit en azote diaminé 0/0	4,31	4,20
Trouvé azote du liquide résiduel .	0,0935	0,0917
Soit en azote monoaminé 0/0 . .	9,76	9,72

Il est intéressant de grouper ces chiffres en un tableau en les

rapprochant de ceux qui ont été obtenus par OSBORNE pour la caséine (1), à l'aide d'une méthode analogue :

	Zymocaséine I		Zymocaséine II		Caséine du lait	
	0/0 de substance	0/0 d'azote	0/0 de substance	0/0 d'azote	0/0 de substance	0/0 d'azote
azote ammoniacal	1,41	6,86	1,41	6,89	1,61	10,30
— humique	0,65	4,02	0,41	2,54	0,21	1,30
— diaminé ou basique.	4,31	26,67	4,20	26,07	3,49	22,40
— monoaminé.	9,76	60,39	9,72	60,33	10,31	66,00
— total déterminé . .	15,83	97,94	15,44	95,83	15,62	100,00
au lieu de	16,16	100,00	16,11	100,00		

Comme on le voit, la différence porte surtout sur l'ammoniaque, qui est produite en plus grande quantité dans l'hydrolyse de la caséine du lait. Néanmoins, il y a une concordance assez satisfaisante : tout au plus peut-on remarquer que la caséine du lait fournit un peu moins d'azote basique que celle de la levure.

2° *Cérévisine*. — Les échantillons employés provenaient de coagulums obtenus à l'ébullition, séchés à 110° et pulvérisés finement. On les débarrasse des matières étrangères solubles par épuisements répétés à l'eau bouillante. Après dessiccation à 110°, on pèse deux fractions qui sont soumises à l'hydrolyse. On a :

	I	II
	gr.	gr.
Poids de substance	1,064	1,5305
Trouvé azote ammoniacal	0,01022	0,01456
Correspondant en 0/0 à	0,96	0,95
Trouvé azote des substances humi- ques	0,00294	0,00392

(1) OSBORNE, *The vegetable Proteins*, London 1916, p. 57.

	I	II
	mgr.	mgr.
Correspondant en 0/0 à	0,276	0,256
Trouvé azote du précipité phospho- tungstique	0,0412	0,0398
Soit en azote diaminé 0/0	3,86	3,91
Trouvé azote du liquide restant . .	0,1162	0,1691
Soit en azote monoaminé 0/0 . . .	10,92	11,05

En calculant ces résultats en 0/0 de l'azote total, je les met-
trai en regard de ceux qui ont été trouvés par OSBORNE (*loc. cit.*)
pour une albumine végétale, la léguméline des pois :

	Cérévisine I		Cérévisine II		Léguméline de pois	
	0/0 de substance	0/0 d'azote	0/0 de substance	0/0 d'azote	0/0 de substance	0/0 d'azote
azote ammoniacal	0,96	5,89	0,95	5,79	1,04	6,40
— humique	0,276	1,69	0,256	1,56	0,38	1,80
— diaminé ou basique.	3,86	23,69	3,91	23,73	3,45	23,90
— monoaminé.	10,92	67,03	11,05	67,42	11,33	67,90
— total déterminé.	16,016	98,30	16,166	98,50	16,20	100,00
au lieu de	16,29	100,00	16,39	100,00		

La concordance est très remarquable, bien qu'il s'agisse de
deux substances d'origine aussi différente ; elles appartiennent
toutes deux au groupe encore très restreint des albumines végé-
tales typiques, solubles dans l'eau et coagulables par la
chaleur.

Nature de l'azote basique

Les deux substances étudiées contiennent une quantité assez
élevée d'azote sous forme d'azote basique et il m'a paru inté-

ressant d'en étudier la nature de plus près. Nous possédons, en effet, dans la méthode décrite en 1900 par KOSSEL et KUTSCHER (1) et devenue classique un procédé qui dépasse de beaucoup, au point de vue de la précision des résultats, la méthode de E. FISCHER pour la séparation et le dosage des acides mono-aminés (2). En d'autres termes, il apparaît comme plus facile de caractériser les deux nouveaux protéiques par la détermination des quantités d'arginine, d'histidine et de lysine qu'ils fournissent à l'hydrolyse que par celle des acides aminés obtenue au moyen de la distillation fractionnée de leurs éthers.

La recherche a été faite en suivant exactement les données du mémoire de KOSSEL et KUTSCHER : hydrolyse sulfurique, précipitation par la baryte, enlèvement de l'histidine et de l'arginine à l'état de combinaisons argentiques et de la lysine sous forme de phosphotungstate que l'on transforme ultérieurement en picrate. Pour la séparation de l'histidine et de l'arginine, j'ai utilisé la modification de KOSSEL et PRINGLE (3) qui repose sur l'emploi du carbonate de baryum.

1° *Hydrolyse de la zymocaséine.* — L'opération a porté sur 60 gr. de produit séché dans le vide à 37°, qui correspondaient à 34 gr. de substance séchée à 110° jusqu'à poids constant. L'hydrolyse a été obtenue par chauffage de 8 heures avec un mélange de 180 gr. d'acide sulfurique à 66° B. et 360 gr. d'eau.

Le liquide amené au volume de 600 cc. ne réduit pas la liqueur de FEHLING. Un dosage d'azote indique une teneur de 8 gr. 232 soit seulement 15,24 0/0. Après saturation presque complète de l'acide au moyen d'hydrate de baryum pulvérisé, on essore et on épuise le sulfate de baryum par l'eau bouillante. La totalité du liquide est évaporée à 300 cc. ; un dosage d'azote

(1) KOSSEL et KUTSCHER, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 31, p. 163 (1900).

(2) E. FISCHER, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 33, p. 151 (1901). V. aussi *Untersuchungen ueber Aminosäuren, Polypeptide und Proteine*, Berlin 1906.

(3) KOSSEL et PRINGLE, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 49, p. 318 (1906).

ne donne que 7 gr. 469, soit une perte de 0 gr. 763, correspondant à 9,26 0/0 d'azote humique entraîné par le précipité barytique.

Le dosage de l'ammoniaque, par distillation sur un léger excès de magnésie, donne 3,97 0/0 de l'azote total sous forme d'azote ammoniacal, soit 0,603 0/0 du protéique. Le liquide débarrassé d'ammoniaque par la magnésie, de magnésie par la baryte et de la baryte en excès par l'acide sulfurique est additionné à chaud de sulfate d'argent jusqu'à léger excès; on refroidit, on précipite par la baryte, on filtre et on essore le précipité d'arginine et d'histidine argentiques. Ce précipité décomposé donne les bases en solution; on amène le volume à 500 cc. et on dose l'azote. On trouve 2 gr. 1224, soit 23,78 0/0 de l'azote total.

L'histidine est séparée au moyen du carbonate de baryum; le précipité est décomposé et l'azote dosé dans la solution. Trouvé : 0 gr. 3858 d'azote, soit 4,68 0/0 de l'azote total, correspondant à 1 gr. 424 d'histidine ou 2,63 0/0 de zymocaséine. J'ai pu extraire à l'état de dichlorhydrate 0 gr. 998 d'histidine, ce qui correspond seulement à 1,85 0/0.

L'arginine argentique étant précipitée par un excès de baryte est décomposée ultérieurement; la solution contient 0 gr. 623 d'azote, soit 7,56 0/0 de l'azote total, correspondant à 1 gr. 936 d'arginine ou à 3,58 d'arginine 0/0 de zymocaséine. La quantité d'arginine isolée en fait sous forme de nitrate était seulement de 1 gr. 35, soit 2,50 0/0 seulement.

Le liquide dont on a précipité l'histidine et l'arginine est débarrassé d'argent; un dosage d'azote y indique 4 gr. 648 d'azote, soit 56,46 0/0 de l'azote total. On précipite par l'acide phosphotungstique; le précipité lavé est décomposé par la baryte et l'azote dosé. On trouve 1 gr. 0396 d'azote, soit 12,63 0/0 de l'azote total.

Le liquide restant, contenant les acides monoaminés, doit donc renfermer $56,46 - 12,63 = 43,83$ 0/0 de l'azote total. Si le précipité phosphotungstique ne contenait que la lysine, celle-ci représenterait environ 10 0/0 de la zymocaséine. La trans-

formation en picrate étant effectuée, on obtient seulement 5 gr. 672 de picrate cristallisé, correspondant à 2 gr. 208 de lysine ou 4,09 0/0 de zymocaséine. Celle-ci ne représente donc que 5,14 0/0 de l'azote total (1).

On voit qu'indépendamment de l'azote resté dans les précipités, il reste dans les liquides dont on a extrait l'histidine et l'arginine d'une part, la lysine d'autre part, des quantités importantes d'azote sous forme inconnue (2).

Néanmoins, ces résultats vont nous permettre d'établir une comparaison entre la zymocaséine et la caséine du lait, ainsi qu'avec la glutencaséine. On peut, en effet, en s'en tenant à la répartition de l'azote basique entre l'ammoniaque et les trois bases hexoniques de KOSSEL, obtenir le tableau suivant :

	Zymocaséine de levure	Caséinogène du lait (3)	Glutencaséine de blé (3)
Ammoniaque.	0,73	2,0	4,0
Histidine	2,63	2,6	1,8
Arginine	3,58	4,8	4,7
Lysine.	4,09	5,8	1,9

C'est donc surtout par la quantité d'ammoniaque fournie que les différences apparaissent. De plus, la zymocaséine se rapproche de la caséine du lait par sa teneur en lysine, tandis que la glutencaséine est beaucoup plus pauvre.

2° *Hydrolyse de la cérévisine.* — Cette hydrolyse a été effectuée en chauffant 58 gr. 6 de produit séché à 110° jusqu'à poids constant avec un mélange de 180 gr. d'acide sulfurique à 66° B. et 360 gr. d'eau, à l'ébullition, pendant 8 heures.

Le liquide refroidi est amené à 500 cc.; on dose l'azote sur

(1) Tous ces calculs ont été établis en tenant compte des quantités employées aux dosages; ils sont toujours rapportés à la totalité de la substance soumise à l'hydrolyse. Les chiffres indiqués ne nécessitent par suite aucune correction

(2) Cet azote est probablement sous forme d'acides monoaminés; on sait déjà que le liquide duquel a été isolée la lysine renferme une partie importante de la phénylalanine libérée par hydrolyse, et précipitée en même temps par l'acide phosphotungstique.

(3) ABDERHALDEN, *Lehrbuch d. physiol. Chemie*, 3^e édition, p. 400 (1914).

5 cc. et on obtient 9 gr. 442 d'azote, soit 16,11 0/0 de la cérévisine. Après saturation de l'acide par l'hydrate de baryte, essorage et lavage du précipité, il ne reste plus que 8 gr. 8536 d'azote, soit une perte de 0 gr. 5884 ou 6,22 0/0 d'azote humique, en 0/0 de l'azote total. Le dosage de l'ammoniaque donne une teneur de 3,43 0/0 de l'azote total, correspondant à 0,55 d'azote ammoniacal 0/0 de protéique.

Après séparation de l'histidine et de l'arginine à l'état de combinaisons argentiques, on décompose le précipité et on dose l'azote dans la totalité de la solution obtenue : on trouve ainsi 1 gr. 774 d'azote, soit 18,78 0/0 de l'azote total pour le précipité renfermant les deux bases. L'histidine argentique étant de nouveau séparée au moyen du carbonate de baryum, on la met en solution et on dose l'azote : on trouve 0 gr. 32 d'azote, soit 3,39 0/0 de l'azote total. Ce chiffre correspond à 1 gr. 184 d'histidine, soit 2,02 0/0 de protéine. La quantité d'histidine obtenue n'a été que de 0 gr. 87.

La combinaison argentique de l'arginine est précipitée, lavée et décomposée. On dose l'azote dans la solution et on obtient, pour la totalité, 0 gr. 7474 d'azote, soit 7,91 0/0 de l'azote total, correspondant à 2 gr. 318 d'arginine, ou 3,95 0/0 de protéine. La quantité d'arginine, obtenue à l'état de nitrate cristallisé, était de 1 gr. 95.

Le liquide dont on a séparé l'histidine et l'arginine étant débarrassé d'argent et soumis au dosage de l'azote, on trouve en tout 6 gr. 2733, soit 66,44 0/0 de l'azote total. Le précipité phosphotungstique renferme 1 gr. 352 d'azote, soit 14,32 0/0 de l'azote total. Il y a donc pour les acides monoaminés $66,44 - 14,32 = 52,12$ 0/0 de l'azote total.

Ce précipité étant décomposé, on précipite la lysine à l'état de picrate. Ce sel recueilli et séché pèse 10 gr. 752, qui correspondent à 4 gr. 186 de lysine, soit 7,14 0/0 de protéine. L'azote correspondant est 0 gr. 8028 ou 8,50 0/0 de l'azote total.

On peut déduire de ces divers dosages que les quantités d'histidine et d'arginine obtenues après purification des combinaisons argentiques de ces deux bases sont notablement plus

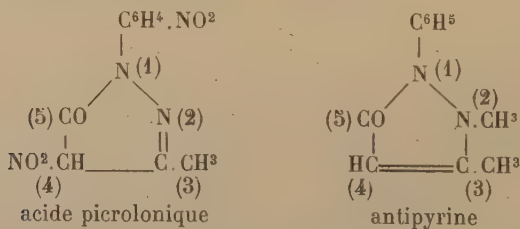
faibles que celles qui paraissaient devoir être présentes d'après le dosage de l'azote dans l'ensemble du précipité argentique.

J'ai essayé, dans une deuxième hydrolyse, d'améliorer les rendements et je suis arrivé aux chiffres suivants :

L'hydrolyse a porté sur 30 gr. de cérévisine, qui ont été chauffés pendent 14 heures avec 90 gr. d'acide sulfurique et 180 gr. d'eau. J'ai obtenu, en azote ammoniacal, 2,634 0/0 de l'azote total ou 0,424 0/0 de substance. Par suite d'un accident, la fraction histidine a été perdue après sa séparation. Pour l'arginine, la combinaison argentique est décomposée, la liqueur débarrassée d'acide sulfurique par la baryte et de l'excès de baryte par un courant de gaz carbonique. On concentre, on filtre et le liquide évaporé à 10 cc. environ est additionné d'un léger excès d'acide picrolonique (1) dissous dans l'alcool chaud. Après quelques instants, le liquide se trouble et il se dépose un abondant précipité cristallin jaune clair. On recueille après 20 heures, on lave, on sèche et on pèse. On obtient ainsi 3 gr. 45 de picrolonate d'arginine, correspondant à 1 gr. 37 d'arginine, soit 4,42 0/0 de protéine. Quant à la lysine, on a obtenu 6 gr. 25 de picrate de cette base, correspondant à 2 gr. 43 de lysine, soit 8,10 0/0 de protéine (2).

On peut maintenant comparer les résultats obtenus pour la cérévisine à ceux qui ont été publiés pour d'autres albumines

(1) L'acide picrolonique, décrit par BERTRAM (*Dissertation*, Iéna 1892), est le 4-paranitrophényl-3-méthyl-4-nitropyrazolone-5, $C^{10}H^8O^5N^4$. C'est une antipyrine dinitrée en paraphényl et en (4), et déméthylée en (2) :



(2) La plupart de ces résultats analytiques ont été publiés en collaboration avec Mme S. KOŁODZIEJSKA (*C. R. Acad. Sciences*, t. 457, p. 243 (1913)).

végétales, comme par exemple la léguméline de pois. On trouve :

	Cérévisine	Léguméline (1)
Ammoniaque	0,67	1,23
Histidine	2,02	2,27
Arginine	4,42	5,45
Lysine	8,10	3,03

Comme on le voit, la concordance dans les chiffres de répartition de l'azote obtenus par la méthode de HAUSMANN modifiée disparaît dès que l'on met en regard les quantités de chacune des bases elles-mêmes ou sans doute de chacun des acides aminés pris isolément.

Si la léguméline est une protéine assez riche en arginine, on voit que la cérévisine est l'une des plus riches en lysine (2) qui soient connues. C'est là un caractère intéressant qui donne à cette albumine une place à part et suffit à la distinguer des autres protéines d'origine végétale.

*
* *

Il est instructif de comparer, au point de vue de la répartition de l'azote, les chiffres obtenus dans l'hydrolyse sulfurique de la zymocaséine et de la cérévisine avec ceux qui ont été donnés par la méthode de HAUSMANN (p. 122 et 123). Ces chiffres sont en 0/0 de l'azote total.

	Zymocaséine		Cérévisine	
	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique
Azote ammoniacal	6,86	3,97	5,89	3,43
Azote humique	4,02	9,26	1,69	6,22

(1) OSBORNE, *The vegetable Proteins*, p. 59.

(2) D'après les résultats de SCHRÖDER (*loc. cit.*), qui a extrait jusqu'à 8,68 0/0 de lysine du mélange indéterminé, contenant vraisemblablement à la fois zymocaséine et cérévisine, qu'il a soumis à l'hydrolyse, la teneur de la cérévisine en lysine doit être encore plus élevée et comprise entre 9 et 10 0/0, car celle de la zymocaséine ne paraît pas atteindre 5 0/0.

	Zymocaseïne		Cérévisine	
	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique
Azote du précipité argentique contenant arginine et histidine. .	»	25,78	»	18,78
Azote du précipité phosphotungstique	»	12,63	»	14,32
Azote de l'histidine.	»	4,68	»	3,39
Azote de l'arginine.	«	7,56	»	8,84
Azote de la lysine	»	5,44	»	9,64
Azote total des trois bases . .	26,67	17,38	23,69	21,87
Azote des acides monoaminés :				
directement	60,39	43,83	67,03	52,12
par différence	62,45	69,39	68,73	68,48

Il est facile de déduire de ce tableau un certain nombre de faits intéressants.

1° On voit que l'hydrolyse sulfurique produit moins d'ammoniaque et plus de substances humiques que l'hydrolyse chlorhydrique dans la méthode de HAUSMANN. Mais le total de l'azote ammoniacal et de l'azote humique ne change guère : 13,23 au lieu de 10,88 pour la zymocaseïne, 9,63 au lieu de 7,58 pour la cérévisine. Ceci vient confirmer les faits signalés par KOSSEL et KUTSCHER (1) à propos de l'hydrolyse de la gluten-caséine par l'acide sulfurique à 1/3 en volume ou 1/3 en poids, et par UDRANSKY (2) au sujet de l'origine des substances humiques : celles-ci proviendraient surtout de l'action des acides sur les groupements susceptibles de fournir de l'ammoniaque par hydrolyse ;

2° La précipitation de l'histidine et de l'arginine au moyen des sels d'argent est accompagnée par celle de produits azotés inconnus en quantité assez élevée, et il n'y a pas concordance entre les deux méthodes : on ne peut donc considérer la somme de l'azote enlevé par le précipité argentique et de l'azote enlevé ensuite par la précipitation avec l'acide phosphotungstique comme représentant l'azote basique ;

(1) KOSSEL et KUTSCHER, *loc. cit.*

(2) UDRANSKY, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 42, p. 42 (1888).

3° Le précipité phosphotungstique qui contient la lysine renferme également d'autres corps (en particulier, comme on le sait maintenant, la phénylalanine). La détermination de l'azote basique dans la méthode de HAUSMANN conduit donc toujours à des résultats trop forts, et d'autant plus élevés qu'il y a plus de ces produits dans la molécule étudiée.

Nature des acides monoaminés

La recherche et la séparation des acides monoaminés peuvent être faites par la méthode d'éthérification de E. FISCHER, à condition de posséder une quantité assez importante de substance. J'ai dû, pour cette raison, renoncer momentanément à ce travail. Il ne faut d'ailleurs pas exagérer l'importance de cette lacune au point de vue du but poursuivi actuellement, qui est surtout de rechercher les caractéristiques les plus importantes des deux protéiques de la levure. La méthode d'éthérification, même entre des mains expertes, comporte des causes d'erreur assez importantes pour que les résultats qu'elle fournit aient beaucoup plus que la valeur d'indications sur les quantités des divers acides aminés présents dans la molécule (1).

Nous avons déjà, grâce au travail de SCHROEDER (*loc. cit.*), d'utiles renseignements sur certains de ces acides aminés. Ainsi, nous savons que le glyocolle n'existe pas dans les protéiques étudiés, que la phénylalanine, la tyrosine et la cystine ne peuvent s'y trouver qu'en très faible quantité. Il ne faut donc probablement pas compter sur ces corps pour nous fournir des caractères différentiels.

On en peut dire autant de la leucine ; présente dans toutes les molécules des protéiques en quantité assez notable, sa détermination, d'ailleurs difficile à faire exactement, ne nous apprendrait pas grand chose.

(1) ABDERHALDEN et WEIL, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 74, p. 445 (1911); t. 77, p. 59 (1912).

Celle des acides aspartique et glutamique semblerait devoir être plus profitable. Il en est de même du dosage du tryptophane, élément plus particulier, tant au point de vue de sa structure chimique qu'à celui de son importance physiologique, et dont la présence imprime à la molécule protéique un caractère beaucoup plus tranché.

Pour cette raison, je me suis proposé surtout de doser cet acide aminé dans les protéiques étudiés.

Dosage du Tryptophane. — Les solutions de zymocaséine, aussi bien que celles de cérévisine, donnent par addition d'une solution d'acide glyoxylique puis d'acide chlorhydrique concentré un anneau d'un violet intense à la surface de séparation des deux couches : c'est la preuve que ces protéiques contiennent du tryptophane (1). En raison de l'intensité de la réaction obtenue, il est à prévoir que la quantité de cet acide aminé est assez notable.

En examinant les travaux publiés sur le dosage du tryptophane, on se trouve en présence de plusieurs méthodes ; la première est basée sur l'isolement direct du produit, les autres sur l'obtention d'une réaction colorée dont on apprécie l'intensité.

1° *Méthode par isolement en nature.* — Elle a été employée par HOPKINS et COLE (2) qui ont utilisé la digestion trypsique pour détacher le tryptophane de la molécule protéique, puis l'ont séparé par précipitation au moyen du sulfate mercurique en milieu acidifié par l'acide sulfurique. Après décomposition du précipité lavé au moyen d'hydrogène sulfuré, on recommence encore une fois ce traitement. La solution obtenue est concentrée jusqu'à cristallisation ; finalement, on sèche et on pèse. HOPKINS et COLE ont ainsi directement retiré de la caséine 1,5 0/0 de son poids de tryptophane. Ce résultat, que les auteurs indiquent comme un minimum en raison des pertes inévitables, est à retenir.

(1) ABDERHALDEN, *Lehrbuch d. physiol. Chemie*, 3^e édit., p. 380 (1914).

(2) F. G. HOPKINS et S. COLE, *J. of Physiology*, t. 27, p. 418 (1901).

2° *Méthode de titrage basée sur l'emploi d'une réaction colorée.*

— Le tryptophane en solution pas trop étendue donne avec l'eau de brome une coloration rouge violacé. Cette réaction a été d'abord utilisée par LEVENE et ROUILLER (1) pour le dosage volumétrique au moyen d'une solution titrée d'eau de brome. La fin du titrage était indiquée par le virage de la coloration du rouge-violet au jaune, ce qui correspond à la transformation du mélange de tryptophane monobromé et dibromé en combinaison dibromée.

3° *Méthodes colorimétriques.* — FASAL (2) a indiqué en 1912 un procédé basé sur l'action de l'acide sulfurique en présence de l'acide glyoxylique (réaction de HOPKINS). Il se fait une coloration violette que l'auteur compare, au colorimètre, avec une gamme colorée obtenue au moyen d'une solution titrée de tryptophane pur (3).

Plus récemment, HERZFELD (4) a publié une méthode qui repose sur l'emploi du p-diméthylaminobenzaldéhyde en présence d'acide chlorhydrique. La coloration bleue qui apparaît progressivement est comparée, au colorimètre ou au spectrophotomètre, à celle que fournit une solution titrée de tryptophane pur, comme dans la méthode de FASAL.

Le procédé qui consiste à extraire le tryptophane en nature est celui qui donne les résultats les plus certains ; il exige naturellement une quantité importante de matière protéique, ce qui le rend inapplicable dans beaucoup de cas. Je me suis attaché pour cette raison à étudier les méthodes colorimétriques, d'une application commode lorsque l'on ne dispose que de petites quantités de substance. Leur précision laisse tou-

(1) P. LEVENE et C. ROUILLER, *J. of biol. Chemistry*, t. 2, p. 481 (1907).

(2) FASAL, *Biochem. Zeits.*, t. 44, p. 392 (1912).

(3) VOISENET (*Bull. Soc. chimique*, 4^e sér., t. 23, p. 36f, 1918) trouve que l'acide glyoxylique n'intervient dans la réaction d'ADAMKIEWICZ des protéiques qu'en fournissant de l'aldéhyde formique sous l'action de l'acide sulfurique concentré. Il remplace ce réactif par une solution de formol au 1/100. VOISENET n'indique pas si la réaction telle qu'il l'a modifiée reste caractéristique du tryptophane, ce qui est le point important.

(4) E. HERZFELD, *Biochem. Zeits.*, t. 56, p. 258 (1913).

jours à désirer, mais elle est au moins de même ordre que celle des méthodes d'isolement qui permettent actuellement de doser les acides aminés.

J'ai donc repris l'étude du procédé indiqué par FASAL. Cet auteur prend 0 gr. 1 de substance desséchée jusqu'à poids constant, y ajoute 2 cc. de solution d'acide glyoxylique (obtenue par réduction d'une solution saturée d'acide oxalique avec l'amalgame de sodium), puis 6 cc. d'acide sulfurique concentré; après avoir mélangé, il compare au colorimètre DUBOSQ avec le type de la gamme colorimétrique qui paraît le plus voisin de la teinte obtenue.

FASAL, voulant contrôler sa méthode, détermine la teneur en tryptophane de la caséine; il trouve le chiffre de 0,65 0/0. Comme dans une préparation faite par ABDERHALDEN et KEMPE (1) ces auteurs avaient obtenu avec la caséine 0,53 0/0 de tryptophane, FASAL considère l'accord comme satisfaisant, sa méthode colorimétrique excluant, dit-il, les pertes.

En fait, en répétant le dosage selon FASAL avec de la caséine desséchée en poudre, j'ai obtenu le chiffre de 0,6 0/0. Il semble donc qu'il y a concordance. Malheureusement, on observe qu'après quelques heures de repos le mélange coloré en violet laisse surnager des grains très fins fortement colorés. C'est qu'une partie de la caséine ne s'est pas dissoute dans l'acide, accident presque inévitable avec la plupart des protéiques lorsqu'ils ont été séchés à l'étuve. J'ai alors pris de la caséine du même échantillon que j'ai finement pulvérisée au mortier d'agate, tamisée au tamis de soie fin, puis séchée jusqu'à poids constant. Une détermination faite sur cette poudre m'a donné la valeur de 1,78 0/0, la totalité du produit passant en dissolution dans l'acide sulfurique.

Ce chiffre peut être considéré comme en parfait accord avec celui de HOPKINS et COLE, qui est d'ailleurs indiqué par ABDERHALDEN lui-même dans ses ouvrages (2). En travaillant avec la

(1) E. ABDERHALDEN et KEMPE, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 52, p. 208 (1907).

(2) ABDERHALDEN, *Lehrbuch d. physiol. Chemie*, 3^e édit., p. 400 (1914).

méthode de FASAL, on peut donc arriver à des résultats satisfaisants, si on prend la précaution de pulvériser la substance assez finement pour qu'elle passe entièrement en dissolution dans l'acide ; l'auteur paraît avoir négligé cette précaution et par suite tous les résultats publiés par lui semblent bien douteux. Sa méthode présente pourtant un très grave inconvénient : c'est de donner des colorations très variables, allant du bleu au rouge-violet, par toutes les teintes du violet. La comparaison au colorimètre avec la teinte bleue donnée par le tryptophane pur devient dès lors difficile, souvent impossible. Lorsqu'il s'agit de protéiques très riches en groupements hydrocarbonés, la couleur est toujours rabattue par une proportion variable de brun et la comparaison est impossible. J'indiquerai simplement que la détermination du tryptophane par cette méthode dans les protéiques de la levure m'a donné les résultats approximatifs suivants :

Zymocaséine	2,00 à 2,50 0/0
Cérévisine	2,40 à 2,67 —

Les déterminations faites avec la zymocaséine sont douteuses pour la raison indiquée plus haut.

La méthode de HERZFELD paraît devoir éviter les inconvénients de la précédente. En effet, le tryptophane, préalablement libéré de la molécule par la digestion trypsique, est mis en évidence au moyen de réactifs moins violents et les colorations obtenues semblent être en rapport plus direct avec sa teneur dans la molécule protéique.

HERZFELD prend 1 gramme de protéique séché qu'il dissout dans 50 cc. d'une solution de carbonate de sodium à 0,5 0/0, ajoute 0 gr. 5 de pancréatine et laisse digérer 24 heures à l'étuve en présence de chloroforme et de toluène. Après ce temps, il mesure exactement 50 cc. de liquide refroidi et filtré, y ajoute 10 cc. de réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde puis 40 cc. d'acide chlorhydrique concentré et laisse

30 heures à la température ordinaire (1). Le liquide bleu est alors comparé, au colorimètre ou au spectrophotomètre, avec celui qui est fourni par une solution titrée de tryptophane. Bien entendu, le tryptophane contenu dans la pancréatine est déterminé par une expérience de contrôle et il en est tenu compte dans le calcul du résultat.

Dans quatre déterminations faites avec la caséine, HERZFELD trouve : 0,52-0,53-0,51-0,50 ; moyenne : 0,515 0/0. En opérant par sa méthode, j'ai trouvé de 1,3 à 1,4 0/0. Quelles peuvent être les raisons de cette divergence ? Il y en a plusieurs.

D'abord, ici encore, la finesse de la poudre a son importance, car la dissolution dans le carbonate de sodium étendu peut n'être pas complète. Des poudres fines de caséine m'ont donné 1,60 et 1,63 au lieu de la teneur indiquée plus haut. Avec certaines substances, la finesse de la poudre ne suffit pas toujours et il faut avoir recours à un autre moyen, comme nous le verrons plus loin.

D'autre part, la durée de la digestion employée par HERZFELD (24 heures) est insuffisante pour détacher la totalité du tryptophane fixé dans la molécule. HOPKINS et COLE indiquent de laisser la digestion jusqu'à ce que la réaction à l'eau de brome soit maximum, ce qui peut exiger 7 jours. On sait d'ailleurs que la quantité de tryptophane libérée augmente nettement dans les premiers jours de la digestion.

Enfin, HERZFELD paraît négliger complètement l'action de la lumière sur le développement de la réaction colorée qu'il utilise. J'ai observé qu'un mélange laissé à l'obscurité se colore beaucoup plus lentement qu'un autre mélange identique placé en pleine lumière. Sur une table, dans un laboratoire, des différences d'éclairement produisent des différences d'intensité dans la couleur des échantillons placés côte à côte. De plus, la durée de 30 heures qu'il indique est plutôt insuffisante ; j'ai

(1) Ce réactif a la composition suivante :

p-diméthylaminobenzaldéhyde	20 gr.
Acide chlorhydrique concentré	500 cc.
Eau	500 cc.

obtenu après 48 heures et même 60 heures des résultats plus comparables.

J'ajouterai qu'il n'y a aucun intérêt, au point de vue de la précision, à remplacer le colorimètre par le spectrophotomètre : ces deux instruments se complètent plutôt. Le colorimètre donne de très bons résultats pour comparer les teintes bleues de faible ou moyenne intensité, dans lesquelles une légère différence de coloration ne gêne pas la comparaison et dont le pouvoir absorbant est trop petit, sous faible épaisseur, pour permettre utilement l'emploi du spectrophotomètre. Inversement, ce dernier instrument convient très bien pour comparer des solutions intensément colorées, avec lesquelles l'emploi du colorimètre n'est pas recommandable (1).

J'ai, en tenant compte de ces faits, employé le mode opératoire suivant :

La substance desséchée est pulvérisée finement et tamisée à travers un tissu de soie serrée, puis la poudre est séchée à l'étuve jusqu'à poids constant. On pèse exactement un poids voisin de 0 gr. 40 de produit et on le dissout, en broyant au mortier, par petites portions, dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 0/0. On complète ensuite à 200 cc. avec cette solution. Certaines substances ne se dissolvent pas complètement dans ces conditions. On prend alors une quantité convenable de préparation à l'état humide, soit coagulée par la chaleur, soit précipitée et lavée, et on l'essore avec soin. On prélève deux portions de même poids — environ 2 grammes — de la masse humide et on dessèche l'une à l'étuve jusqu'à poids constant, tandis que l'autre est dissoute dans 200 cc. de la solution de carbonate de sodium. On connaît ainsi le poids de matière sèche en solution.

La solution, additionnée de 0 gr. 10 d'une préparation active de pancréatine, puis de 5 cc. de chloroforme et de 5 cc. de toluène, est placée à l'étuve à 37° et abandonnée à cette tem-

(1) J'ai employé dans ces recherches le spectrophotomètre de Ch. FÉRY, construit par la maison BEAUDOIN, rue Lhomond, à Paris.

pérature. On prélève après chaque période de 24 heures un volume déterminé de liquide que l'on essaie à l'eau de brome après neutralisation. Quand la coloration ne paraît plus augmenter d'intensité (5 à 7 jours), on prélève avec une pipette une certaine quantité de liquide que l'on filtre et on mesure 50 cc. de filtrat auquel on ajoute 10 cc. de réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde, préparé comme plus haut, puis assez d'acide chlorhydrique concentré et pur pour amener le volume à 100 cc. On mélange et on laisse à la lumière, en disposant à côté, soumis au même éclaircissement, un ballon semblable dans lequel on a mis avec le réactif et l'acide chlorhydrique, 50 cc. d'une solution de tryptophane pur (1) de richesse connue (0,004 à 0,010 0/0). Après 40 à 48 heures, on compare les teintes au colorimètre ; on fait de nouveau cette comparaison après 50 à 60 heures et on calcule la richesse en tryptophane.

Voici un exemple de détermination. On a digéré un poids de caséine correspondant à 0 gr. 45 de produit sec, dissous dans 200 cc. de solution avec 0 gr. 10 de trypsine. La réaction est faite sur 50 cc. de solution, amenés à 100 cc. Une épaisseur de 0,95 de ce liquide correspond au colorimètre à une épaisseur de 1,0 du liquide obtenu avec 10 cc. de solution de tryptophane à 0,02 0/0 amenés à 100 cc.

La solution de tryptophane contient :

$$\frac{0,02 \times 10}{100} = 0,002 \text{ 0/0 de tryptophane.}$$

La solution de caséine contient :

$$\frac{0,002 \times 1}{0,95} = 0,0021 \text{ 0/0 de tryptophane.}$$

La totalité de la digestion de caséine contient :

(1) Le tryptophane qui a servi à ces comparaisons provenait de la maison HOFFMANN LA ROCHE, place des Vosges, à Paris.

Il est commode d'en préparer une solution à 0,02 0/0, que l'on dilue plus ou moins au moment de l'expérience.

$$\frac{0,0021 \times 200}{50} = 0 \text{ gr. } 0084 \text{ de tryptophane.}$$

La trypsine employée renfermait, d'après la détermination préalable, 0,70 0/0 de tryptophane, soit 0 gr. 0007 pour 0 gr. 10, quantité utilisée.

Il reste donc $0,0084 - 0,0007 = 0 \text{ gr. } 0077$ de tryptophane pour 0,45 de caséine, ce qui fait :

$$\frac{0,0077 \times 100}{0,45} = 1,71 \text{ 0/0.}$$

En travaillant dans ces conditions, j'ai obtenu avec les protéiques de la levure les teneurs suivantes :

	I	II	III	moyenne
Zymocaséine	1,64	1,40	1,50	1,51
Cérévisine	2,20	2,14	2,50	2,28

Si on compare ces chiffres à ceux qui ont été fournis par la méthode de FASAL (2 à 2,50 pour la zymocaséine, 2,40 à 2,67 pour la cérévisine), on voit que la concordance, assez bonne pour l'albumine de levure, ne l'est pas pour la phosphoprotéine ; j'ai dit déjà que la présence de groupements hydrocarbonés modifie la couleur de la réaction glyoxylique et peut fausser le dosage basé sur cette coloration.

Comme on le voit, la teneur de la caséine en tryptophane, variable entre 1,7 et 1,8 0/0 d'après les deux méthodes (1),

(1) Antérieurement à la publication de HERZFELD, W. von MORACZEWSKI (*Biochem. Zeits.*, t. 51, p. 340, 1913) dans un travail sur les quantités d'indol produites dans la digestion et la putréfaction de certains protéiques, arrive à la conclusion que la caséine fournit très peu d'indol et par suite contient peu de tryptophane. D'après la quantité d'indol trouvée, il calcule une teneur de 0,6 0/0, voisine de celle indiquée par FASAL. Mais, comme le fait remarquer avec raison HERZFELD dans son travail (*loc. cit.*, p. 260), les méthodes basées sur la détermination de l'indol obtenu par décomposition au moyen des bactéries et le calcul ultérieur du tryptophane correspondant ne conduisent pas à des résultats constants. On peut néanmoins s'étonner que ce dernier auteur trouve, par sa méthode, un chiffre assez voisin de celui de MORACZEWSKI, et concordant, en somme, avec le résultat fourni par le procédé qu'il critique.

concorde suffisamment avec les résultats de HOPKINS et COLE pour pouvoir être admise.

La zymocaséine de la levure, déjà si proche de la caséine du lait par d'autres caractères, s'en rapproche encore par sa teneur très voisine en tryptophane (1,5 0/0).

Enfin, la cérévisine, avec sa teneur de 2,3 0/0 environ, est l'une des substances protéiques les plus riches en tryptophane, sinon la plus riche, qui soient connues; cette richesse, jointe à la quantité élevée de lysine qu'elle donne à l'hydrolyse, suffit à la faire classer dans un groupe tout à fait à part.

Hydrolyse diastasique

Les protéiques de la levure subissent facilement l'hydrolyse diastasique; le suc de levure lui-même contient des protéases très actives, puisque après quelques jours de conservation à l'étuve à 37°, il ne renferme plus d'albumine coagulable, ainsi que l'ont d'abord montré GERET et HAHN. Le tableau suivant, donné par ces auteurs, indique bien la marche de la digestion (1) :

	Extrait sec	Azote total	Poids de coagulum	Azote du coagulum	Azote du liquide
Suc frais . . .	12,12	1,45	5,99	0,93	0,52
Après 1 jour . .	—	—	1,87	0,25	1,19
— 2 — . . .	—	—	0,50	0,05	1,40
— 4 — . . .	—	—	0,28	0,025	1,42
— 6 — . . .	—	—	0,21	0,02	1,43

D'après eux, il s'agit d'une endotryptase qui serait accompagnée d'érepsine. Les recherches plus récentes de DERNBY (2) ont montré dans le suc de levure la présence d'une peptase, d'une tryptase et d'une érepsine analogues à celles du tube digestif de l'homme. Les concentrations optima en ions hydrogène pour ces ferments sont : $p_H = 4-4,5$ pour la peptase, $p_H = 7,0$ pour la tryptase, $p_H = 7,8$ pour l'érepsine.

(1) HAHN et GERET, *Die Zymasegährung*, 2^e partie, p. 295.

(2) DERNBY, *Biochem. Zeits.*, t. 81, p. 107 (1917).

La présence d'érepsine explique pourquoi HAHN et GERET n'ont pu trouver de peptones dans le suc de levure autolysé. Après une digestion poursuivie pendant une heure seulement, à 37°, il n'existe que des traces d'albumoses, pas de peptones, et le liquide contient déjà de faibles quantités de leucine et de tyrosine. Si on fait une digestion ralentie à la glacière, à une température de 5°, on obtient au bout de 14 jours 0 gr. 5 seulement de deutéroalbumose pour 100 cc. de suc (1). La présence de peptone aurait été constatée par WROBLEWSKI dans le suc de levure (2), probablement par erreur.

Ce sont évidemment ces mêmes ferments qui agissent dans l'autodigestion de la levure et qui donnent finalement toute une série d'acides aminés. Sans s'arrêter aux recherches anciennes de BÉCHAMP (3), de SCHUTZENBERGER (4), de NÆGELI et LÖEW (5), de SALKOWSKI (6), etc., il faut arriver aux travaux de KUTSCHER (7) qui donne une liste assez complète de ces acides aminés : acide aminobutyrique, leucine, tyrosine, acides aspartique et glutamique, histidine, arginine, lysine. On y trouve aussi de l'ammoniaque, de la choline et des bases puriques, guanine et adénine surtout, xanthine et hypoxanthine à l'état de traces. Ces dernières proviennent évidemment de l'action d'une nucléase.

J'ai essayé de produire l'hydrolyse diastasique des protéiques de levure, isolés et mis à l'abri des ferments autolytiques, au moyen de pepsine et de trypsine animales.

1° *Zymocaséine*. — Une solution de 2 grammes de zymocaséine dans 100 cc. de carbonate de sodium à 0,3 0/0 est additionnée d'acide chlorhydrique étendu jusqu'à neutralisation ; on verse alors un excès d'acide, tel que la teneur en HCl réel

(1) HAHN et GERET, *loc. cit.*, p. 307.

(2) WROBLEWSKI, *loc. cit.*

(3) BÉCHAMP, *C. R. Acad. Sciences*, t. 61, p. 689 (1865) et suiv.

(4) SCHUTZENBERGER, *C. R. Acad. Sciences*, t. 78, p. 493 (1874).

(5) NÆGELI et LÖEW, *J. f. prakt. Chemie*, t. 125, p. 403 (1878).

(6) E. SALKOWSKI, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 13, p. 506 (1889).

(7) KUTSCHER, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 32, p. 59 et 419 (1901) ; t. 34, p. 517 (1902). KUTSCHER et LOHMANN, *Ibid.*, t. 39, p. 159 et 313 (1903).

soit de 0,3 0/0, puis on ajoute 0 gr. 10 de pepsine active (1) et on place au bain-marie à 45°.

Après 30 minutes, le précipité, devenu d'abord translucide, a presque disparu. Au bout de 2 heures, on neutralise, on filtre et on examine les réactions du liquide. Celui-ci, acidulé par l'acide acétique, ne se trouble pas par chauffage à l'ébullition. Par addition ménagée d'acide nitrique, il donne un trouble qui disparaît par un léger chauffage et reparait par refroidissement. Saturé avec du sulfate d'ammonium ou du sulfate de zinc en poudre fine, il donne un léger précipité blanc. Ce liquide contient donc des albumoses, mais en faible quantité.

La solution dont on a précipité les albumoses* par le sulfate d'ammonium est filtrée et soumise à une dialyse rapide, afin d'enlever la majeure partie du sel dissous. Le liquide clair ne précipite plus par l'acide nitrique, mais donne avec l'alcool un précipité un peu visqueux ; avec le chlorure mercurique, il fournit un précipité blanc volumineux. Les réactions colorées présentent des intensités variables :

Biuret	intense (rose violacé)
Xanthoprotéique	faible
MILLON	faible
HOPKINS	nette
LIEBERMANN	nette

Il s'agit donc bien de peptone.

La solution de zymocaséine dans le carbonate de sodium, additionnée de 0 gr. 10 de trypsine commerciale (2) et soumise à la digestion au bain-marie à 45° devient tout à fait transparente et fluide au bout de peu de temps. Après 2 à 3 heures, le liquide ne précipite plus que faiblement par l'acide nitrique ; il montre les mêmes réactions que celui qui provient de la digestion pepsique.

2° *Cérévisine*. — J'ai employé environ 10 grammes de coagu-

(1) Pepsine ARMOUR, titrant 360 d'après l'essai du Codex.

(2) Trypsine très active, provenant de MERCK.

lum humide obtenu par chauffage de la solution acidifiée à l'ébullition et lavage à l'eau bouillante.

Cette masse humide a été délayée dans l'acide chlorhydrique étendu contenant 0,3 0/0 d'acide réel et placée au bain-marie à 45° après addition de 0 gr. 10 de pepsine. Le coagulum se gonfle et en quelques instants la masse entière devient gélatineuse et transparente ; la liquéfaction se produit ensuite très rapidement. Au bout de 2 heures, on peut constater dans le liquide filtré et neutralisé la présence d'albumoses et de peptones, avec peut-être une proportion d'albumose plus élevée que dans le cas de la zymocaséine.

Si on ajoute à ce liquide 10 0/0 de suc de levure LEBEDREW et si on l'abandonne à l'étuve à 37° après addition de toluène et de chloroforme pour en assurer la stérilité, on voit que la réaction du biuret diminue très vite d'intensité ; elle a totalement disparu au bout de 3 jours.

Le coagulum humide de cérévisine, délayé dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 0/0, additionné de 0 gr. 10 de trypsine et placé au bain-marie à 45°, se gonfle et se dissout très rapidement. Au bout de 2 à 3 heures, il montre également la présence d'albumoses et de peptones.

La cérévisine séchée à 110° et pulvérisée constitue une poudre formée de particules très dures et très résistantes ; aussi ne se laisse-t-elle pas attaquer rapidement par les ferments digestifs. Il est nécessaire, si on emploie ce produit, de le pulvériser très finement et de tamiser la poudre obtenue, pour obtenir des digestions suffisamment avancées.

On voit en résumé qu'il est possible d'obtenir des peptones véritables avec les protéiques de la levure ; c'est seulement la présence d'érepsine dans le suc de levure qui fait disparaître ces peptones dans les produits d'autolyse.

CHAPITRE IV

UTILISATION DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

On a depuis longtemps songé à l'utilisation de la levure au point de vue alimentaire ; il existe déjà dans le commerce un certain nombre de préparations, ayant surtout la forme d'extraits de viande, qui sont obtenues par divers procédés en partant de la levure.

Sans aborder la question de la nature de ces produits et en restant sur le terrain purement scientifique, on peut tirer des résultats qui ont été exposés précédemment des conclusions intéressantes au point de vue de l'utilisation des protéiques étudiées par l'organisme.

Nous devons admettre actuellement, d'après RONA (1), qu'il ne se produit dans l'organisme animal aucune transformation d'un acide aminé dans un autre, ni aucune nouvelle formation d'un acide aminé, à l'exception du glycocolle. Donc les acides aminés qui n'existent pas dans les protéiques des aliments ingérés ne se font pas dans l'organisme.

Ces acides aminés n'ont certainement pas tous la même importance, chacun pouvant jouer un rôle particulier. On entrevoit déjà ce rôle pour quelques-uns d'entre eux : on sait depuis longtemps que la gélatine, qui ne renferme ni phénylalanine, ni tyrosine, ni tryptophane, est incapable de maintenir, à elle-

(1) P. RONA, *Handbuch d. Biochemie* de OPPENHEIMER, Jena 1908, t. 4, 1^{re} partie, p. 550.

seule, l'organisme en état d'équilibre azoté ; il en est de même de la zéïne, à laquelle manquent le glycocolle, la lysine et le tryptophane. D'autre part, la gliadine du blé et l'hordéine de l'orge, auxquelles font défaut le glycocolle et la lysine, peuvent assurer le maintien de l'équilibre azoté chez l'individu adulte, mais elles ne suffisent pas pour permettre en même temps le développement de l'individu jeune, non encore arrivé au stade de développement complet. Au contraire, la caséine, la lactalbumine, l'ovalbumine, l'édestine, la gluténine (gluten-caséine), permettent aussi bien le maintien de l'équilibre que le développement (1).

Le rôle du tryptophane, en particulier, a été bien mis en évidence par ABDERHALDEN (2). Cet auteur a prouvé qu'un animal peut être nourri complètement avec les produits d'hydrolyse des protéiques. En employant les acides aminés résultant de l'hydrolyse de la caséine, soit en entier, soit débarrassés de tryptophane, il a montré que ce dernier est un constituant indispensable à l'entretien de l'équilibre azoté et ne pouvant être remplacé.

Cette observation suggère l'idée qu'un aliment peu favorable, soit parce qu'il lui manque un ou plusieurs acides aminés indispensables, soit parce que les proportions de ces acides y sont par trop différentes de celles qui existent dans les protéiques de notre propre organisme, peut être amélioré par addition d'un autre protéique contenant les substances qui font défaut ou rétablissant les rapports désirables entre les acides aminés. Des corps comme la zymocaséine et surtout la cérévisine, dont la richesse en lysine et en tryptophane est exceptionnelle, pourraient ainsi jouer un rôle considérable dans l'alimentation, surtout chez les individus en voie de développement, en étant simplement adjoints à des protéines végétales comme celles de l'orge ou du maïs, dans lesquelles il y a déficit de ces acides

(1) OSBORNE et MENDEL, *Revue américaine Science*, t. 34, p. 722 (1911). Voir également divers travaux des mêmes, dans *J. of biolog. Chemistry*, t. 10, 11, 12 et 13 (1911-1912), contenant la bibliographie.

(2) ABDERHALDEN, *Zeits. physiol. Chemie*, t. 77, p. 22 (1912).

aminés indispensables. On conçoit facilement l'intérêt économique d'un pareil fait.

Je n'ai pu, faute de moyens suffisants, vérifier cette hypothèse si vraisemblable. Je me suis contenté, avec la quantité assez faible de cérévisine dont je disposais, de m'assurer que ce protéique permet de maintenir à lui seul l'équilibre azoté.

L'animal en expérience était un jeune chien, non encore parvenu peut-être à son complet développement, qui a reçu pendant quelques jours une ration, copiée sur celle des expériences d'ABDERHALDEN, formée de 50 grammes de viande de cheval, 20 grammes de graisse, 20 grammes de glucose, 20 grammes d'amidon et 5 grammes de cendres d'os. L'équilibre étant à peu près obtenu après 5 jours, l'animal a reçu dans les jours suivants une ration identique, mais dans laquelle la viande était remplacée par 57 grammes de cérévisine coagulée humide. La quantité de boisson était identique pendant la durée de l'expérience (125 gr. d'eau).

Voici les chiffres obtenus :

Jours	Poids	Régime	Azote ingéré	Urine émise	Azote de l'urine	Poids des fèces	Azote des fèces	Azote éliminé	Bilan
	k.		gr.	cc.	gr.	gr.	gr.	gr.	
1	3,260	viande	4,41	105	1,33	10,2	0,12	1,45	-0,04
2	3,270		—	120	1,38		0,12	1,50	-0,09
3	3,295	cheval	—	100	1,29		0,11	1,40	+0,01
4	3,300		—	90	1,27	8,0	0,11	1,38	+0,03
5	3,290	50 gr.	—	130	1,30		0,12	1,42	-0,01
6	3,305	cérévi-	4,43	100	1,28		0,12	1,40	+0,03
7	3,315		—	110	1,33	11,4	0,12	1,45	-0,02
8	3,320	sine	—	120	1,36		0,14	1,50	-0,07
9	3,320		—	95	1,27		0,13	1,40	+0,03
10	3,310	57 gr.	—	115	1,38		0,14	1,52	-0,09
11	3,295		—	100	1,35		0,13	1,48	-0,05

L'expérience est évidemment trop courte pour être absolument démonstrative ; elle confirme néanmoins les expériences antérieures de VÖELTZ (1) et celles de VÖELTZ et BAUDREXEL (2),

(1) W. VÖELTZ, *Pfuger's Archiv.*, t. 107, p. 388 (1905).

(2) W. VÖELTZ et A. BAUDREXEL, *Biochem. Zeits.*, t. 30, p. 457 ; t. 34, p. 355 (1911).

qui en faisant ingérer de la levure en nature à des animaux, ont obtenu une utilisation des protéiques s'élevant à 86 0/0 de la quantité contenue dans la levure absorbée. Dans l'expérience qui vient d'être rapportée, l'utilisation des protéiques de la viande étant de 91,5 0/0, celle de la cérévisine s'est élevée jusqu'à 92,8 0/0, ce qui s'explique peut-être par l'absence complète d'enveloppes cellulaires, de fibres, etc., la totalité du protéique ayant pu être digérée.

RÉSULTATS GÉNÉRAUX ET CONCLUSIONS

Voici, sommairement exposés, les principaux résultats obtenus au cours de ce travail :

1° L'urée peut convenir à l'alimentation de la levure comme unique source d'azote, en présence de sucre. Elle favorise le développement du végétal et permet à celui-ci, en même temps, de former une zymase active.

2° Avec des teneurs en sucre voisines de 10 0/0, dans un milieu minéral, l'assimilation de l'urée est médiocre et la levure formée est pauvre en azote ; si on élève la proportion de sucre à 20 0/0, la quantité d'urée assimilée augmente beaucoup, le poids de levure formé est plus grand, cette levure est plus riche en azote.

3° Si, toutes choses égales d'ailleurs, on introduit dans les cultures des quantités croissantes d'urée, la quantité de levure formée et la quantité d'azote assimilé tendent vers un maximum ; il en est de même, par conséquent, de la teneur centésimale en azote. Ce fait paraît avoir une portée générale. La valeur du maximum dépend de la quantité de levure ensemencée et de la nature de l'aliment azoté.

4° Il y a un parallélisme étroit entre les fermentations produites dans un milieu donné, avec une levure déterminée, lorsque l'azote est fourni, tantôt sous forme d'urée, tantôt sous forme du sel ammoniacal correspondant ; il est donc extrêmement probable que l'assimilation de l'urée est précédée de sa transformation en ammoniaque.

5° L'acétamide, la propionamide, la butyramide, sont des aliments azotés bien plus médiocres que l'urée ; seule, la formiamide paraît comparable à cette dernière, mais on doit réserver toute conclusion à son sujet, le produit expérimenté n'étant pas pur.

6° Il n'a pas été possible de manifester la présence d'uréase ni de ferment hydrolysant l'acétamide, soit dans les cultures ou les macérations de levure, soit dans le suc de presse obtenu en partant de levure développée sur un milieu à urée.

7° De tous les faits déjà constatés, on peut tirer cette conclusion que la levure, comme les végétaux verts, construit les matières azotées de son protoplasma à partir de l'ammoniaque et de produits ternaires en relation étroite avec les sucres. L'azote qui lui est fourni sous forme de combinaisons organiques est ramené à l'état d'ammoniaque avant toute utilisation. Les amides ne paraissent pas donner lieu à une exception à cette règle.

8° Les cultures de levure dans les milieux où l'azote est donné sous forme d'amides, seules ou mélangées à des sels ammoniacaux, renferment des quantités importantes d'acide formique. En général, il n'y a pas de relation entre la quantité de cet acide et la quantité de levure produite, non plus qu'avec l'activité de cette levure vis-à-vis du sucre. L'acide formique ne provient pas de la molécule de l'amide consommée ; sa formation paraît être en rapport avec la décomposition du sucre en alcool et gaz carbonique, comme le supposent H. FRANZEN et STEPPUHN. Cet acide pourrait être un terme de passage qui ne persiste pas dans les conditions habituelles ; sa destruction ou sa transformation se trouvant entravées en présence des amides, il s'accumulerait alors dans le milieu.

9° On peut extraire par macération aqueuse de la levure, préalablement lavée et séchée selon les données de LEBEDEV, deux protéiques nouveaux, dont l'un est une phosphoprotéine, l'autre étant une albumine vraie. Les rendements sont considérablement accrus si on opère en milieu faiblement alcalin à la température de 35°.

10° Ces protéiques sont en moyenne dans le rapport de 1 du premier pour 3 du second. Ils existent dans le suc de levure de BUCHNER préparé soit à la manière ordinaire, soit par congélation à basse température ; on est donc en droit d'admettre leur préexistence dans la levure vivante.

11° La phosphoprotéine, à laquelle j'ai donné le nom de zymocaséine, est insoluble dans l'eau, soluble dans les alcalis et les carbonates alcalins ; elle renferme 16,15 0/0 d'azote et 1,80 0/0 de phosphore. Par ses propriétés, elle se place entre la caséine du lait et la vitelline de l'œuf ; elle coagule sous l'action de la présure, mais moins complètement que la caséine du lait. Dans le suc de levure, elle coagule également sous l'action d'une présure, peu active du reste, qui se trouve dans ce suc. Par ses caractères de coloration, la zymocaséine se rapproche des substances de réserve des grains d'aleurone et des corpuscules métachromatiques, sans que l'on puisse conclure à l'identité.

12° L'albumine de levure, que j'ai appelée cérévisine, est soluble dans l'eau et coagulable par la chaleur dès 41° ; elle donne plusieurs coagulations jusqu'à 70°, sans qu'il soit permis de parler de plusieurs substances différentes. Elle renferme 16,35 0/0 d'azote et 0,90 0/0 environ de soufre avec des traces de phosphore probablement accidentelles. Par ses réactions colorées, elle se comporte comme les substances protoplasmiques.

13° L'étude de l'hydrolyse acide de la zymocaséine confirme le rapprochement déjà fait de cette substance avec la caséine du lait, au point de vue de la répartition de l'azote et des quantités d'histidine, arginine et lysine qu'elle renferme. Quant à la cérévisine, elle paraît assez voisine de certaines albumines végétales comme la léguméline de pois ; elle en diffère cependant par sa moindre teneur en arginine et par sa richesse en lysine, qui en fait le protéique le plus riche en lysine qui soit actuellement connu. C'est à cette albumine qu'il faut en effet rapporter le résultat déjà obtenu par SCHROEDER avec un mélange mal défini.

14° Parmi les acides monoaminés résultant de l'hydrolyse, le plus important est le tryptophane, qui est fourni en quantité notable par les deux protéiques : la zymocaséine en contient 1,51 0/0 et la cérévisine 2,28 0/0. Cette dernière est actuellement le protéique le plus riche en tryptophane qui soit connu.

15° La teneur particulièrement élevée de la cérévisine en tryptophane et en lysine pourrait faire jouer à ce protéique un rôle important dans l'alimentation, en lui permettant de suppléer, par son mélange avec certains aliments, à l'insuffisance de ceux-ci en acides aminés indispensables. La cérévisine est très assimilable par l'organisme animal et permet de le maintenir en équilibre azoté.

16° L'hydrolyse des protéiques de levure sous l'action de la pepsine et de la trypsine conduit à la formation d'albumoses et de peptones, lorsque l'on opère sur des produits isolés de la levure. L'absence de peptones habituellement constatée dans les produits d'autolyse de la levure ou dans le suc de levure est due à l'activité de l'érepsine qui s'y trouve.

Enfin, j'ai donné la description d'un appareil simple pour le dosage de l'ammoniaque en présence des amides facilement altérables comme l'urée ; d'autre part, j'ai fait connaître les causes d'erreur des méthodes de dosage colorimétriques du tryptophane décrites par divers auteurs et indiqué une technique qui donne des résultats satisfaisants.

D'une manière générale, j'ai pu montrer que s'il n'est pas possible de suivre dans ses différentes phases la transformation de l'aliment azoté fourni à la levure en substances protoplasmiques, rien ne permet de séparer ces processus de transformation de ceux qui conduisent à la synthèse des protéiques chez les végétaux à chlorophylle.

D'autre part, les protéiques formés dans l'assimilation azotée de la levure paraissent s'éloigner par certains côtés des

protéiques végétaux déjà connus et en particulier de ceux qui forment les réserves des graines.

De nouvelles recherches, entreprises chez divers représentants des champignons et des bactéries montreront sans doute si les protéiques de la levure constituent les premiers types d'un nouveau groupe.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE DES AUTEURS CITÉS

Formation des protéiques chez les végétaux

1. ABDERHALDEN, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 3^e édit., Berlin, 1914.
ABDERHALDEN et RONA, Die Zusammensetzung des Eiweiss von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 46, p. 179 (1908).
2. G. ANDRÉ, Chimie Végétale (*Encyclop. agricole*). Paris, 1909.
3. BACH, Sur le mécanisme chimique de la réduction des azotates et de la formation des matières quaternaires azotées dans les plantes. *C. R. Acad. Sciences*, t. 122, p. 1499 (1896).
4. BAUDISCH, Ueber Nitrat und Nitrit Assimilation. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 44, p. 1009 (1911).
BAUDISCH et MAYER, Lichtchemische Vorlesungsversuche von pflanzenphysiologischem Interesse. *Id.*, t. 45, p. 1771 (1912); t. 46, p. 115 (1913).
5. BUTKEWITSCH, Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. *Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik*, t. 38, p. 147 (1903).
6. F. EHRLICH, Ueber die Entstehung des Fuselöles. *Zeits. Verein. d. deut. Zuckerindustrie*, t. 55, p. 539 (1905).
7. A. FERNBACH et M. SCHÖN, L'acide pyruvique, produit de la vie de la levure. *C. R. Acad. Sciences*, t. 157, p. 1478 (1913) t. 158, p. 1719 (1914).
8. A. FISCHER, Vorlesungen über Bakterien. Jena, 1897.
9. HANSTEEN, Ueber Eiweiss-synthese in grünen Phanerogamen. *Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik*, t. 33, p. 417 (1899).

10. JOST, Pflanzenphysiologie. Trad. anglaise de Gibson Oxford, 1907.
11. LUTZ, Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique. *Thèse*, Paris, 1898.
12. NÆGELI, *Botan. Mittheilungen*, t. 3, p. 395 (1879).
13. PRIANISCHNIKOW, Zur Frage der Asparaginbildung. *Ber. deut. botan. Gesell.*, t. 22, p. 35 (1904).
14. SCHIMPER, Ueber Kalkoxalatbildung in den Laubblättern. *Botan. Zeitung*, t. 46, p. 65 (1888).
15. E. SCHULZE, Ueber den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 24, p. 18 (1898).
E. SCHULZE, Ueber die Argininbildung in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. *Ber. deut. botan. Gesell.*, t. 22, p. 381 (1904).
16. TREUB, Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* Reinw. *Ann. J. botan. Buitenzorg*, t. 13, p. 1 (1895).
TREUB, Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes. *Id.*, 2^e série, t. 4, p. 86 (1905).
17. G. TRIEB, Ueber einfache Pflanzenbasen und ihre Beziehungen zum Aufbau der Eiweissstoffe und Lezithin. Berlin, 1912.
18. ZALESKI, Die Bedingungen der Eiweissbildung in den Pflanzen (en russe, Karkoff, 1900). *Botan. Centralbl.*, t. 87, p. 277 (1901).

Utilisation des amides par la levure

1. BEIJERINCK, Zur Ernährungsphysiologie des Kähmpilzes. *Centralbl. f. Bakter.*, t. 11, p. 68 (1892).
2. E. BUCHNER, Alkoolische Gährung ohne Hefezellen. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 30, p. 117 (1897).
3. DUCLAUX, Etudes relatives à l'absorption de l'ammoniaque et à la production d'acides gras volatils pendant la fermentation alcoolique. *Thèse*, Paris, 1865.
DUCLAUX, Sur le dosage de l'alcool dans les vins. *Ann. chim. et phys.*, 5^e série, t. 2, p. 233 (1874).
DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. 3, Paris, 1900.
4. F. EHRLICH, Ueber die Bildung des Plasmaeiweiss bei Hefen und Schimmelpilzen. *Biochem. Zeits.*, t. 36, p. 477 (1911).
5. FRÉSENÍUS. *Traité d'analyse chimique quantitative*, trad. Gautier, 7^e édit. française, Paris,

6. HAYDUCK, Ueber die Entwicklung der Hefe in Nährlösungen von verschiedenem stickstoffgehalt. *Zeits. f. Spiritusindustrie*, 1881, p. 173.
7. IWANOW, Ueber synthetische Prozesse der Hefeautolyse. *Biochem. Zeits.*, t. 63, p. 359 (1914).
8. KUTSCHER, Chemische Untersuchungen über die Selbstgärung der Hefe. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 32, p. 59 (1901).
9. LEBEDEW, Extraction de la zymase par simple macération. *C. R. Acad. Sciences*, t. 152, p. 49 (1911).
10. MAQUENNE, Sur le dosage du glucose par la méthode de Lehmann. *Bull. Soc. Chim.*, 3^e série, t. 19, p. 926 (1898).
11. MAYER, Untersuchungen über die alcoolische Gärung. 1869.
12. MIQUEL, Sur le ferment soluble de l'urée. *C. R. Acad. Sciences*, t. 111, p. 397 (1890).
MIQUEL, Etudes sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. *Ann. de Micrographie*, t. 5, p. 371 (1893).
13. NENCKI et ZALESKI, Ueber die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 33, p. 193 (1901).
14. NEUBAUER et FROMHERZ, Ueber den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 70, p. 326 (1911).
15. PASTEUR, Mémoires sur la fermentation alcoolique. *Ann. chim. et physique*, 3^e série, t. 58, p. 323 (1860).
PASTEUR, Etudes sur la Bière. Paris, 1876.
16. PRINGSHEIM, Der Einfluss der chemischen Constitution der Stickstoffnahrung auf die Gährfähigkeit der Hefe. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 39, p. 4048 (1906).
PRINGSHEIM, Ueber die Stickstoffernährung der Hefe. *Biochem. Zeits.*, t. 3, p. 121 (1907).
17. SHIBATA, Ueber das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, t. 5, p. 384 (1904).
18. STERN, The Nutrition of Yeast. *J. of chem. Society*, t. 79, p. 943 (1901).
19. P. THOMAS, Sur la nutrition azotée de la levure. *C. R. Acad. Sciences*, t. 133, p. 312 (1901).
20. VAN TIEGHEM, Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique. *Thèse*, Paris, 1864.
21. WATERMAN, Die Stickstoffnahrung der Presshefe. *Folia microbiologica*, t. 2, p. 173 (1913).
22. ZEMPLÉN, Ueber die Verbreitung der Urease bei höheren Pflanzen. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 79, p. 229 (1912).

Production d'acide formique par la levure

1. BUCHNER et MEISENHEIMER, Die chemischen Vorgänge bei der alcoolischen Gährung. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 43, p. 1773 (1910).
2. DUCLAUX, Recherches sur les vins. Sur les acides volatils du vin. *Ann. chim. et physique*, 5^e série, t. 2, p. 289 (1874).
DUCLAUX, Sur l'action antiseptique de l'acide formique. *Ann. Institut Pasteur*, t. 6, p. 593 (1892).
3. FRANZEN et GREVE, Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. Ueber die Vergärung der Ameisensäure durch *Bacillus prodigiosus*. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 64, p. 169 (1910).
Ueber die Vergärung der Ameisensäure durch *Bacillus Plymouthensis*. *Id.*, t. 67, p. 251.
FRANZEN et EGGER, Ueber die Vergärung der Ameisensäure durch *Bacillus Kiliense* in konstant zusammengesetzten Nährböden. *Id.*, t. 83, p. 226 (1913).
Ueber die Vergärung der Ameisensäure durch *Bacillus prodigiosus*. *Id.*, t. 79, p. 177. Voir aussi : t. 88, p. 73 ; t. 90, p. 311 (1914).
FRANZEN et STEPPUHN, Ueber die Vergärung und Bildung der Ameisensäure durch Hefen. *Id.*, t. 77, p. 129 et t. 78, p. 164 (1912).
4. IWANOW, Sur la production des acides volatils dans les cultures du bacille charbonneux. *Ann. Institut Pasteur*, t. 6, p. 131 (1892).
5. KAYSER, Contribution à la nutrition intracellulaire des levures. *Ann. Institut Pasteur*, t. 14, p. 605 (1900).
6. KHOUDABACHIAN, Sur la présence de l'acide formique dans les raisins et les vins. *Ann. Institut Pasteur*, t. 6, p. 600 (1892).
7. KITICSAN, Ueber einige Bestandtheile des Weindestillates. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 16, p. 1179 (1883).
8. LEBEDEV et GRIAZNOW, Ueber den Mechanismus der alcoolischen Gärung. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 45, p. 3256 (1912).
9. LIEBERMANN, Nachweis der schweflige Säure im Wein. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 15, p. 437 et 2553 (1882).
10. MAZÉ, Fermentation alcoolique de l'acide lactique. *C. R. Acad. Sciences*, t. 156, p. 1101 (1913).
11. NEUBERG et HILDESHEIMER, Ueber Zuckerfreie Hefegärungen. *Biochem. Zeits.*, t. 34, p. 170 (1911).
NEUBERG et TIR, *Id.*, *Ibid.*, t. 32, p. 323.

- NEUBERG et KERB, Zur Frage der Aldehydbildung bei der Gährung von Hexosen sowie bei der sogen. Selbstgährung. *Id.*, t. 58, p. 158 (1913). Zur Frage der Bildung von Milchsäure bei der Vergärung von Brenztraubensäure durch lebende Hefe nebst Bemerkungen über die Gärungsvorgänge. *Id.*, t. 62, p. 489 (1914).
12. RAYMAN et KRUIS, Chemische-biologische Studien, 1891.
13. SCHADE, Ueber die Vergärung des Zuckers ohne Enzyme. *Zeits. physikal. Chemie*, t. 57, p. 1 (1907).
SCHADE, Ueber die Vorgänge der Gärung vom Standpunkt der Katalyse. *Biochem. Zeits.*, t. 7, p. 299 (1907).
14. P. THOMAS, Sur la production d'acide formique dans la fermentation alcoolique. *C. R. Acad. Sciences*, t. 136, p. 1015 (1903).
15. WOHL, Die neueren Ansichten über den chemischen Verlauf der Gärung. *Biochem. Zeits.*, t. 5, p. 45 (1907).

Les protéiques de la levure

1. ABDERHALDEN, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 3^e édit., Berlin, 1914.
ABDERHALDEN, Fütterungsversuche mit vollständig abgebauten Nahrungsstoffen. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 77, p. 22 (1912).
ABDERHALDEN et WEIL, Ueber die bei der Isolierung der monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste. *Id.*, t. 74, p. 445 (1911); t. 77, p. 59 (1912).
2. BABES, Ueber isoliert färbbare Antheile von Bakterien. *Zeits. f. Hygiene*, t. 5, p. 173 (1889).
BABES, Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen. *Id.*, t. 20, p. 412 (1895).
3. BÉCHAMP, Sur l'épuisement physiologique et la vitalité de la levure de bière. *C. R. Acad. Sciences*, t. 61, p. 689 (1865).
BÉCHAMP, Nouvelles recherches sur l'épuisement physiologique de la levure de bière. *Id.*, t. 78, p. 645 (1874).
4. BEIJERINCK et VAN HEST, Lebedeff's Hefemazerationsaft. *Folia microbiologica*, t. 4, p. 107 (1916).
5. BLUM et FULD, Ueber eine neue Methode der Labbestimmung und über das Verhalten des menschlichen Magenlafs unter normalen und pathologischen Zuständen. *Berl. klin. Wochenschrift*, n^o 44a, 1905.
6. BOKORNY, Albumin in der Hefe. *Zeits. f. Spiritusindustrie*, t. 18, p. 33 (1900).

7. BOULLANGER, Action des levures de bière sur le lait. *Ann. Institut Pasteur*, t. 11, p. 720 (1897).
8. E. BUCHNER, Alkoolische Gährung ohne Hefezellen. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 30, p. 117 (1897).
E. BUCHNER, H. BUCHNER et M. HAHN, Die Zymasegährung, Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gährungsproblems. München et Berlin, 1903.
9. DERNBY, Studien über die proteolytische Enzyme der Hefe und ihre Beziehung zu der Autolyse. *Biochem. Zeits.*, t. 81, p. 107 (1917).
10. E. FISCHER, Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 33, p. 151 (1901).
E. FISCHER, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. Berlin, 1906.
11. E. FULD, Ueber die Verbindungen der Eiweisskörper mit Metaphosphorsäure. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, t. 2, p. 155 (1902).
E. FULD, Zur Theorie und Technik des sogenan. Morgenroth-Versuches. *Biochem. Zeits.*, t. 4, p. 54 (1907).
12. GERBER, Analogie entre la coagulation du jaune d'œuf et la caséification du lait par le latex de l'Euphorbia Characias L. *C. R. Soc. Biologie*, t. 74, p. 53 (1913).
13. GERET et HAHN, Zum Nachweis des im Hefepresssaft enthaltenen proteolytischen Enzyms. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 31, p. 202 (1898).
GERET et HAHN, Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. *Id.*, t. 31, p. 2335.
14. GIGLIONI, Di un metodo nuovo e semplice per separare la zimasia dal lievito di birra e per estrarre generalmente gli enzimi dai tessuti viventi. *Atti d. Societa Italiana per il Progresso delle Scienze*, octobre 1911.
15. GUILLIERMOND, Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. *Thèse*, Paris et Lyon 1902.
GUILLIERMOND, Les Levures (*Encyclop. Scientifique*). Paris, 1912.
GUILLIERMOND et MAWAS, Caractères histochimiques des granulations des Mastzellen et rapport de ces corps avec la volutine des protistes. *C. R. Soc. Biologie*, t. 64, p. 307 (1908).
GUILLIERMOND et BEAUVÉRIE, Caractères histochimiques des globoides de l'aleurone. *Id.*, t. 64, p. 482.
16. HAUSMANN, Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 27, p. 95 (1899); t. 29, p. 136 (1900).

17. HENRY et AULD, On the probable Existence of Emulsin in Yeast. *Proc. Royal Society*, ser. B, t. 76, p. 568 (1905).
18. KAYSER, Action de la chaleur sur les levures. *Ann. Institut Pasteur*, t. 3, p. 513 (1889).
19. KOHL, Die Hefepilze. Leipzig, 1908.
20. A. KOSSEL, Ueber das Nuclein der Hefe. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 3, p. 284 (1879); t. 4, p. 290 (1880), et suiv.
A. KOSSEL, Untersuchungen über die Nucleine, Strassburg, 1881.
KOSSEL et KUTSCHER, Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 31, p. 165 (1900).
KOSSEL et PRINGLE, Ueber Protamine und Histone. *Id.*, t. 49, p. 301 (1906).
21. KUTSCHER, Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 32, p. 59 et 419; t. 34, p. 517 (1902).
KUTSCHER et LOHMANN, Die Endprodukte der Pankreas und Hefeselbstverdauung. *Id.*, t. 39, p. 159 et 313 (1903).
22. VAN LAER, Brevet D.R.P. 117303, 1898. Voir *Chem. Centralbl.*, t. 1, p. 352 (1901).
23. LEBEDEV, Extraction de la zymase par simple macération. *C. R. Acad. Sciences*, t. 152, p. 49 (1911).
24. A. MEYER, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. *Botan. Zeitung*, t. 62, p. 113 (1904).
25. MORGENROTH, Ueber den Antikörper des Labenzym. *Centralbl. f. Bakter.*, t. 26, p. 349 (1899).
26. NÆGELI et LÆW, Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe. *J. f. prakt. Chemie*, t. 47, p. 403; *Liebig's Annalen*, t. 193, p. 322 (1878).
27. OSBORNE, The vegetable Proteins. London, 1916.
OSBORNE et HARRIS, Nitrogen in Protein Bodies, *J. of amer. chem. Society*, t. 25, p. 323 (1913).
OSBORNE et MENDEL, Revue américaine « *Science* », t. 34, p. 722 (1911); *J. of biol. Chemistry*, t. 10, 11, 12 et 13 (1911-1912).
28. PALLADIN, Zur Kenntniss der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweissabbau und Atmung der Pflanzen. *Biochem. Zeits.*, t. 44, p. 318 (1912).
29. PAYEN, sur le développement des végétaux, 3^e mémoire. *Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des sciences*, t. 9, p. 32 (1846).
30. PFEFFER, Physiologie végétale, trad. Friedel. Paris, 1905.

31. PLIMMER et SCOTT, A Reaction distinguishing Phosphoprotein from Nucleoprotein and the Distribution of Phosphoproteins in Tissues. *J. of the chem. Society*, t. 93, p. 1699 (1908).
32. REINKE et RODEWALD, Die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas von *Aethalium septicum*. *Untersuchung a. d. botan. Institut d. Univers. Göttingen*, h. 2, p. 54 (1881) et *Botan. Zeitung*, t. 38, p. 315 (1880).
33. P. RONA, Oppenheimer's Handbuch der Biochemie, Jena, 1908-1912.
34. SALKOWSKI, Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 13, p. 506 (1889).
35. SCHLOSSBERGER, Ueber die Natur der Hefe, mit Rücksicht auf die Gährungserscheinungen. *Liebig's Ann. Chem. u. Pharm.*, t. 51, p. 193 (1844).
36. SCHRÖDER, Zur Kenntniss der Proteinsubstanzen der Hefe. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, t. 2, p. 389 (1902).
37. SCHUTZENBERGER, Faits pour servir à l'histoire de la levure de bière. *C. R. Acad. Sciences*, t. 78, p. 493 (1874).
38. SEDLMAYR, Beiträge zur Chemie der Hefe. *Zeits. f. d. ges. Brauwesen*, t. 26, p. 384 (1903).
39. STUTZER, Vorkommen von Nuclein in den Schimmelpilzen und in der Hefe. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 6, p. 572 (1882).
40. P. THOMAS, Sur les substances protéiques de la levure. *C. R. Acad. Sciences*, t. 156, p. 2024 (1913).
- P. THOMAS et S. KOŁODZIEJSKA, Les substances protéiques de la levure et leurs produits d'hydrolyse. *Id.*, t. 157, p. 243 (1913).
41. UDRANSKY, Ueber Furfurolreactionen. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 12, p. 42 (1888).
42. VÖLTZ, Ueber den Einfluss verschiedener Eiweisskörper und einiger Derivate derselben auf den Stickstoffumsatz. *Pflüger's Archiv*, t. 107, p. 388 (1905).
- VÖLTZ et BAUDREXEL, Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus. *Biochem. Zeits.*, t. 30, p. 457 (1911).
43. VOZARIK, Verfahren zur Veraschung von Nahrungsmittel und von anderen organischen Stoffen zwecks Bestimmung ihres Phosphorgehalt. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 76, p. 426 (1912).
44. WROBLEWSKI, Zusammensetzung der Buchner'schen Hefepresssaftes. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. 31, p. 3218 (1898).
45. *Proc. amer. physiol. Society* dans *Amer. J. of Physiology*, t. 21 (1908).

Dosage du tryptophane

1. ABDERHALDEN, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 3^e édit., Berlin, 1914.
 - ABDERHALDEN et KEMPE, Beitrag zur Kenntniss des Tryptophans und einiger seiner Derivate. *Zeits. physiol. Chemie*, t. 52, p. 207 (1907).
 2. FASAL, Ueber eine colorimetrische Methode der quantitativen Tryptophanbestimmung, etc. *Biochem. Zeits.*, t. 44, p. 392 (1912).
 3. HERZFELD, Ueber eine quantitative Tryptophanbestimmungsmethode. *Biochem. Zeits.*, t. 56, p. 258 (1913).
 4. HOPKINS et COLE, Proteid Chemistry. A hitherto undescribed Product of tryptic Digestion. *J. of Physiology*, t. 27, p. 418 (1901).
 5. LEVENE et ROULLER, Estimation of Tryptophan in Protein Cleavage Products, *J. of biol. Chemistry*, t. 2, p. 481 (1907).
 6. VON MORACZEWSKI, Ueber die bei künstlicher Verdauung und Faulniss verschiedener Eiweisskörper auftretenden Indolmenge. *Biochem. Zeits.*, t. 51, p. 340 (1913).
 7. P. THOMAS, Présence et dosage du tryptophane dans les matières protéiques de la levure, *Bull. Soc. Chimie Biologique*, t. 1, p. 67 (1914).
 8. VOISENET, Contribution à l'étude de la réaction d'Adamkiewicz et de la transformation de l'acide glyoxylique en méthanal. *Bull. Soc. Chimique*, 4^e série, t. 23, p. 361 (1918).
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

Pages

Formation des protéiques chez les végétaux	3
Plantes autotrophes	4
Plantes hétérotrophes	12

PREMIÈRE PARTIE

NUTRITION AMIDÉE DE LA LEVURE : FORMATION DES PROTÉIQUES

CHAPITRE PREMIER. — Utilisation des amides par la levure. . .	17
Dispositif expérimental employé.	19
Méthodes analytiques	22
Dosage de l'azote ammoniacal	23
Recherches faites avec l'urée.	28
Expériences avec les amides autres que l'urée	40
Recherche de la diastase hydrolysant les amides.	47
Discussion des résultats expérimentaux obtenus	51
Formation des protéiques de la levure.	58
CHAPITRE II. — Production d'acide formique en présence des amides	63
Nature des acides volatils formés	64
Origine de l'acide formique produit par la levure	71

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDES DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

	Pages
CHAPITRE PREMIER. — Préparation des protéiques de la levure . . .	79
Extraction des protéiques.	82
Séparation des protéiques.	91
CHAPITRE II. — Nature des protéiques de la levure.	98
Précipité acétique ou zymocaséine	98
Comparaison avec la caséine.	100
Présure de la levure	103
Coagulum obtenu par la chaleur ou cérévisine	107
Température de coagulation	108
Origine des protéiques de la levure	111
Autres essais de séparation des protéiques.	117
CHAPITRE III. — Etude des produits d'hydrolyse de la zymocaséine et de la cérévisine	120
Répartition de l'azote	120
Nature de l'acide basique.	123
Nature des acides monoaminés	131
Dosage du tryptophane	132
Hydrolyse diastasique	140
CHAPITRE IV. — Utilisation des protéiques de la levure	144
RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.	149
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	155

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Physique. — Les ultramicroscopes.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 28 avril 1914.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. POINCARÉ.

